



Analyse de la régulation du gène Hairless et identification des voies de signalisation affectées chez les mutants “bald Mill Hill”.

Eric J. G. Folco

► To cite this version:

Eric J. G. Folco. Analyse de la régulation du gène Hairless et identification des voies de signalisation affectées chez les mutants “bald Mill Hill”.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble I - Joseph Fourier, 2008. Français. NNT : . tel-01077812

HAL Id: tel-01077812

<https://theses.hal.science/tel-01077812>

Submitted on 27 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NoDerivatives| 4.0 International
License

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur De L'Université Joseph Fourier

Spécialité : Biologie

préparée au laboratoire **Ontogenèse et Cellules Souches du Tégument** dans le cadre de
l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant

présentée et soutenue publiquement par

Eric FOLCO

le 5 Février 2008

Titre :

ANALYSE DE LA RÉGULATION DU GÈNE HAIRLESS ET IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATION AFFECTÉES CHEZ LES MUTANTS « BALD MILL HILL »

Directeur de thèse : Pr. Stefan NONCHEV

Jury

Pr. François BOUCHER,
Pr. Isabelle PELERIN,
Dr. Thierry MAGNALDO,
Pr. Danielle DHOUAILLY,
Dr. Lionel SIMONNEAU,
Pr. Stefan NONCHEV,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Isabelle Pelerin et le Docteur Thierry Magnaldo pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail. Je tiens aussi à remercier le Docteur Lionel Simonneau et le Professeur François Boucher pour avoir jugé et participé à ma soutenance de thèse. Enfin je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Danielle Dhouailly, non seulement pour avoir jugé mon travail mais aussi pour tous les conseils et le soutien que j'ai reçu pendant ma dernière année de thèse. Sans sa patience, ses conseils et sa disponibilité ces derniers mois auraient été infiniment plus durs.

Je tiens à remercier le Professeur Stefan Nonchev, mon directeur de thèse, pour ces 4 années particulièrement enrichissantes tant d'un point de vue humain que d'un point de vue scientifique. Stefan est l'une des personnes les plus gentilles qu'il m'ait été donné de rencontrer, quelqu'un de précieux à connaître.

Je tiens aussi à remercier Rabah, sans qui je n'aurais jamais pu obtenir mon autonomie en tant que scientifique, un gros merci pour ça.

Je tiens à dédicacer ma thèse en premier lieu à mon grand-père, sans qui je n'aurais sans doute jamais pu faire les études qui me plaisaient. Merci papy, j'espère que tu es fier de moi. Je n'oublie pas non plus mes parents, que je remercie sincèrement pour avoir cru en moi tout au long de mes études (du collège à la fac) et m'avoir toujours laissé l'opportunité de faire ce que je voulais. Pardon maman de m'être couché aussi tard pendant toutes mes années de fac, mais tu vois, finalement, ça a payé...

Un merci spécial à mon petit frère, docteur aussi mais en microélectronique, toujours là quand j'ai eu besoin de lui. Merci pour tous ces moments de bonheur et de rigolade. Merci aussi à Sophie pour les soirées bien arrosées dans votre appart' avec cette fameuse tireuse à bière !!

Je n'oublie pas tout le reste de ma famille. Merci pour tous ces bons moments partagés.

Je tiens aussi à remercier tous mes amis du labo, compères de fortune, avec lesquels j'ai passé certains des meilleurs instants de ma vie. Merci pour tous les fous rires, les soirées à filmer jusqu'au bout de la nuit dans l'institut, les repas au RU, les pauses cafés (et je n'oublie pas non plus les discussions scientifiques hein !). Un gros merci à Nico, Cyril, Angeline, Junior, Seb, Jérôme, Gaelh, Marlène, Flore, Beuhbeuh, Fred, Sabrina, Josie, Elo et à tous ceux que j'ai oubliés. (Désolé).

Un merci particulier à Yannick, qui nous a quitté pour la Suisse et le chocolat. Ce sont toujours les meilleurs qui partent en premier. Merci pour toutes les discussions et la déconne. Ces 3 années auraient été bien fades sans toi. Bien entendu je n'oublie pas non plus Agnès, ta moitié, thésarde de « l'autre CRI », une perle de gentillesse, fait bien attention à elle !

Un gros merci aussi à tous mes amis d'enfance qui m'ont soutenu dans les moments difficiles et qui ont toujours été là pour moi.

J'en profite aussi pour remercier toutes les personnes « de l'ombre » sans qui cette thèse aurait été tout simplement impossible. Je pense à Brigitte, Aude, Jacqueline, Martine et tous les autres.

Je tiens aussi à remercier toute la famille Loiodice pour leur soutien pendant toutes ces années, pour les bons petits plats d'Alvine, les conseils avisés de Céline sur la thèse, les câlins de Manon et Marilou, les discussions sur les Comics avec Laurent, sans oublier les concerts à Paris avec Christelle ou encore les soirées foot ou les sorties skis avec Henri. Ce sont des moments précieux.

Enfin un énorme merci à toi mon coeur, ma pupuce, ma petite Claudia sans qui je me serais noyé depuis longtemps dans les méandres de cette thèse. Tu as été mon ancre pendant toutes ces années et tu le seras encore pour les années à venir.

Résumé

Le gène *hairless* (*Hr*) des Mammifères code pour un facteur nucléaire qui est fortement exprimé dans la peau et qui semble participer au cycle de renouvellement du follicule pileux. En l'absence de la protéine Hairless (HR) normale et fonctionnelle, le bulbe du poil subit une apoptose précoce liée à la perte totale et irréversible de pelage. Le phénotype hairless serait donc associé à une prolifération défectueuse des cellules souches du follicule pileux et leur incapacité à migrer et répondre aux multiples signalisations qui régissent leur destinée. La protéine HR est localisée dans le noyau, étroitement liée à la matrice nucléaire et par son association aux facteurs de remodelage de la chromatine, fonctionne comme un corépresseur de récepteurs nucléaires d'hormones. Dans la peau, mais probablement dans d'autres organes, le répresseur HR est responsable de la dynamique dans la différenciation des cellules de la couche basale de l'épiderme et de l'identité des cellules souches du tégument. A l'heure actuelle, la régulation de l'expression gène *Hr* dans l'espace et dans le temps n'est pas élucidée et les partenaires de la protéine HR restent élusifs. Les objectifs majeurs de cette thèse étaient de mieux comprendre aussi bien les bases moléculaires de la régulation du gène *Hr* que la façon dont la protéine HR serait impliquée dans les grandes voies de signalisation qui gouvernent l'homéostasie de la peau et du follicule pileux. La première partie de cette thèse est ainsi centrée sur l'identification des éléments en cis qui gouvernent la régulation et la fonction du promoteur basal du gène *Hr* de la souris. Le site précis d'initiation de la transcription a été déterminé et un nouvel élément en cis de 1,1 kb (RE1) capable d'activer la transcription dans des lignées cellulaires d'origine neurale et cutanée, a été identifié. Grâce à une analyse par délétion et exploration fonctionnelle, il a été montré que le rôle de ce fragment est lié à la présence de sites de fixation de TR (TRE) et VDR (VDRE). De plus, un nouveau motif régulateur de 60 pb (UE60), capable d'interagir avec TRE et VDRE a été défini. Ces données suggèrent l'existence d'un réseau moléculaire complexe qui pourrait lier plusieurs voies de signalisation, responsables de la formation du follicule pileux et mettent en relief l'importance de l'organisation des modules régulateurs au niveau du locus *hairless* des Mammifères. Une grande partie du travail de thèse a été consacrée au décryptage des voies de signalisation qui impliquent la protéine HR dans le contrôle du cycle pileux. La lignée de souris mutantes bald Mill Hill (bmh), récemment décrite a été utilisée comme modèle pour aborder la signalisation par la vitamine D. Il a été montré que la protéine mutante HR bmh, localisée de façon aberrante dans le cytoplasme, pouvait interagir avec VDR, mais était incapable de réprimer l'activation de la transcription assurée par l'intermédiaire de VDR. Des analyses par immunofluorescence ont également montré que la protéine HR bmh présentait une localisation cytoplasmique anormale pas seulement en transfection transitoire, mais aussi dans l'épiderme et le follicule pileux des souris mutantes bmh. Enfin, les profils de localisation extra-nucléaire de la protéine HR bmh ont été abordés. Il a été établi que dans le cytoplasme HR bmh co-localise spécifiquement avec HDAC6 et est capable, de se lier physiquement à cette protéine. L'association de HR bmh avec une composante des complexes à ubiquitine, ainsi que sa localisation dans des endosomes tardifs et des lysosomes suggèrent que la voie endosomale et la dégradation protéique par le protéasome pourraient moduler le phénotype cutané du mutant bmh.

Table des matières

1	Introduction	4
1.1	La peau et les annexes cutanées des mammifères	4
1.1.1	Structure de la peau et du follicule pileux	4
1.1.1.1	La structure de la peau	4
1.1.1.1.1	L'épiderme	4
1.1.1.1.2	La membrane basale	5
1.1.1.1.3	Le derme	5
1.1.1.2	Les annexes cutanées	7
1.1.1.2.1	Les glandes sébacées	7
1.1.1.2.2	Les glandes sudoripares	7
1.1.1.2.3	Les glandes mammaires	7
1.1.1.2.4	Les follicules pileux	8
1.1.2	Formation et maintien du follicule pileux	8
1.1.2.1	Morphogenèse du complexe pilo-sébacé	8
1.1.2.2	Le cycle du poil	12
1.1.2.2.1	Le stade anagène	12
1.1.2.2.2	Le stade catagène	13
1.1.2.2.3	Le stade télogène	15
1.1.2.2.4	Le cycle du poil au niveau moléculaire	15
1.1.2.3	Les cellules souches du tégument	15
1.1.2.3.1	Mise en évidence	16
1.1.2.3.2	Les cellules souches du follicule pileux	17
1.2	Dialogues moléculaires au cours du développement du follicule pileux	18
1.2.1	Formation de la placode et du bourgeon pileux	20
1.2.1.1	Le premier signal dermique	20
1.2.1.2	La formation des placodes	21
1.2.1.2.1	La voie de signalisation des Wnt	21
1.2.1.2.2	Les facteurs de croissances fibroblastiques	23
1.2.1.2.3	La superfamille des « Transforming Growth Factors » (TGF- β)	23
1.2.1.2.3.1	La signalisation « Bone Morphogenetic Protein » (BMP)	23
1.2.1.2.3.2	L'implication des TGF- β dans la formation des placodes	24
1.2.1.2.4	La voie de signalisation de l'ectodysplasine (EDA)	24
1.2.1.2.5	La voie de signalisation Notch	24
1.2.1.3	Les condensations dermiques	25
1.2.1.4	Le second signal dermique	25
1.2.1.5	Différenciation de la tige du poil	27
1.2.1.5.1	La voie de signalisation Notch	27
1.2.1.5.2	La voie des Wnt	28
1.2.1.5.3	La signalisation des BMPs	28

1.2.1.5.4	Les gènes à homéoboîte	28
1.2.1.5.4.1	Les gènes <i>Hox</i>	28
1.2.1.5.4.2	Les gènes <i>Msx1</i> et <i>Msx2</i>	30
1.2.1.5.4.3	Le gène <i>Dlx3</i>	30
1.2.1.5.5	Le rôle de l'acide rétinoïque.	31
1.2.2	Le cycle du poil : contrôle moléculaire et cellulaire par les grandes voies de signalisation	31
1.2.2.1	La phase anagène	33
1.2.2.1.1	Les facteurs de croissance FGF	33
1.2.2.1.2	Le facteur « Epithelial Growth Factor » (EGF)	33
1.2.2.1.3	L'acide rétinoïque et la vitamine D	33
1.2.2.1.4	Les « Insulin-like Growth Factor » (IGF)	34
1.2.2.1.5	La voie de signalisation des Wnt	34
1.2.2.1.6	Sonic Hedgehog	34
1.2.2.2	La phase catagène	35
1.2.2.2.1	Les neurotrophines	35
1.2.2.2.2	Les « Transforming Growth Factors » (TGF- β)	35
1.2.2.2.3	Les facteurs de croissance FGF	36
1.2.2.2.4	Le gène à homéoboites <i>Msx2</i>	36
1.2.2.2.5	Le gène <i>hairless</i>	36
1.2.2.3	La phase télogène	37
1.3	Le gène <i>hairless</i> des mammifères	37
1.3.1	Description du gène <i>hairless</i> : expression et fonction	37
1.3.1.1	Le gène et la protéine Hairless : structure et fonctions	38
1.3.1.1.1	Le gène <i>hairless</i>	38
1.3.1.1.2	La protéine Hairless	39
1.3.1.2	Profil d'expression d'Hairless	40
1.3.2	Les phénotypes Hairless et ses mutants	41
1.3.2.1	Les phénotypes cutanés associés aux mutants <i>hairless</i>	41
1.3.2.1.1	Au niveau du follicule pileux	41
1.3.2.1.2	Les mutants chez l'homme et les phénotypes associés	44
1.3.2.2	Les autres organes affectés chez la souris	44
1.3.3	Mode d'action de la protéine Hairless : les partenaires protéiques et les gènes cibles	45
1.3.3.1	Les Récepteurs nucléaires d'hormones	45
1.3.3.2	Les histones déacétylases	46
1.3.3.3	Hairless et les gènes <i>Hox</i>	46
1.3.3.4	La signalisation Wnt	46
1.3.3.5	Les histones déméthylases à domaine JmJC (Jumonji)	48
1.4	Revue bibliographique	51
2	Résultats	62
2.1	Publication n° 1	62
2.1.1	Identification d'éléments régulateurs en amont du gène <i>hairless</i> de la souris	62
2.1.1.1	Le site d'initiation de la transcription du gène	62
2.1.1.2	Le promoteur essentiel du gène <i>hairless</i>	63
2.2	Publication n° 2	93
2.2.1	L'allèle <i>H^{rhbmh}</i> code pour une protéine Hairless mutante dont la localisation subcellulaire est perturbée	93
2.2.1.1	Fonctions et localisation de HR <i>bmh</i>	94
2.3	Publication n° 3	107
2.3.1	La protéine anormale HR <i>bmh</i> est associée à des protéines cytoplasmiques	107

2.3.1.1	Localisation cytoplasmique hétérogène de la protéine HR bmh	107
2.3.1.2	Le motif surnuméraire ne semble pas jouer de rôle dans la séquestration	107
2.3.1.3	La protéine HR bmh interagit avec la protéine HDAC6	108
3	Discussion	136
3.1	Contrôle du gène <i>Hr</i> – Une boucle d’autorégulation ?	136
3.2	Le phénotype hairless	138
3.3	Les partenaires cytoplasmiques de la protéine HR bmh	139
	Bibliographie	161

Liste des figures

1.1	La peau et le follicule pileux des mammifères	6
1.2	Le développement épidermique et la morphogenèse du bourgeon pileux	9
1.3	Du bourgeon pileux au follicule pileux lors de la vie foetale	11
1.4	Le cycle du poil	14
1.5	Rôles des cellules souches du bulge et de l'épiderme pendant l'homéostasie et après une blessure	19
1.6	Bases moléculaires de la formation des follicules pileux chez l'embryon	22
1.7	Schéma illustrant les différents gradients de molécules impliqués dans la formation de la placode	26
1.8	La voie de signalisation des Wnt	29
1.9	Des voies de signalisation majeures identiques sont impliquées dans la morphogenèse embryonnaire et la régénération lors du cycle du follicule pileux chez l'adulte	32
1.10	Le gène <i>hairless</i> chez la souris et les différentes mutations identifiées	42
1.11	Structure de la protéine Hairless	43
1.12	Phénotype des mutants <i>hairless</i>	47
1.13	Régulation de l'expression de gène par Hairless	50
2.1	Supplemental figure 1 - Design, purification and characterisation of the anti-HR antibody	106

AVANT-PROPOS

Avant-Propos

La peau des mammifères est un organe complexe ayant plusieurs rôles fondamentaux dans le maintien de l'intégrité d'un organisme. Elle est une barrière naturelle protégeant les organes sous-jacents contre les microorganismes, les chocs, ou les rayons du soleil. La peau permet aussi de réguler la température corporelle, notamment grâce aux phanères et aux différentes glandes présentes sous l'épiderme. Le tégument comporte des terminaisons nerveuses permettant aux mammifères d'explorer leur environnement par le toucher et d'avoir la perception des sensations. Enfin, la peau est un gros réservoir de sang.

A cause de son rôle fondamental la peau est au coeur de nombreuses recherches pour décrypter les mécanismes du développement cutané, le devenir des cellules souches épidermiques ou le cheminement moléculaire à la base de la différenciation tégumentaire.

La mise au point de techniques toujours plus performantes en matière d'expérimentation animale a permis de faire de nombreuses découvertes, ces dernières années, sur les gènes impliqués dans le développement et le maintien des follicules pileux. Les travaux que j'ai effectués durant ma thèse sont basés sur l'étude du gène *hairless* et notamment au travers d'un modèle animal, la souris mutante « bald Mill Hill ». Les données concernant le rôle du gène *hairless* dans la formation et le maintien du cycle pilaire sont encore sujettes à de nombreuses questions. Afin de mieux comprendre la régulation fine et précise de ce gène, j'ai entrepris d'étudier sa région promotrice et notamment les possibles interactions avec des facteurs de transcription. Dans un deuxième temps, je me suis intéressé à l'action de la protéine mutante Hairless bald Mill Hill. J'ai étudié son rôle en cultures cellulaires et sur les souris mutantes élevées dans notre laboratoire. Au cours de ce travail, j'ai accumulé des observations et des résultats qui pourraient servir à élucider les mécanismes moléculaires des pathologies alopéciques et des cancers cutanés.

INTRODUCTION

Chapitre 1

Introduction

1.1 La peau et les annexes cutanées des mammifères

1.1.1 Structure de la peau et du follicule pileux

La peau est constituée de deux tissus distincts, de part et d'autre d'une membrane basale, allant de la surface vers la profondeur : Un tissu épithélial, l'épiderme et un tissu conjonctif, le derme. Peu de temps après la gastrulation, les cellules neuro-ectodermiques qui restent à la surface de l'embryon donnent l'ectoderme formé d'une simple couche de cellules. Durant le développement de l'embryon, cette couche de cellules forme l'épiderme stratifié et ses annexes, sous l'influence de cellules qui dérivent du mésoderme pour la majeure partie du corps, et des crêtes neurales pour la face qui forment le derme sous-jacent.

1.1.1.1 La structure de la peau

1.1.1.1.1 L'épiderme

L'épiderme mature est un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux, kératinisé, il est non vascularisé mais innervé. Il est constitué de quatre types cellulaires : les kératinocytes, d'origine ectodermique, les mélanocytes, provenant des crêtes neurales, les cellules de Langerhans, issues de la moëlle hématopoïétique, et les cellules de Merkel [1]. Les kératinocytes représentent 80% des cellules de l'épiderme ; en migrant et se différenciant de sa profondeur vers sa superficie, ils lui donnent ses caractéristiques morphologiques – une stratification et des cellules superficielles pavimenteuses et anuclées. Les 20% de cellules des autres types sont dispersées entre les kératinocytes. Ces kératinocytes se répartissent en couches basale et suprabasales (figure 1.1A). La couche basale ou germinative (stratum germinativum) est la seule couche mitotiquement active et le siège du renouvellement cellulaire constant de l'épiderme. La couche épineuse (stratum spinosum) se compose de plusieurs assises de kératinocytes. Son nom vient de l'observation au microscope « d'épines », correspondant à l'imbrication des membranes plasmiques des cellules soudées entre elles par les desmosomes. La couche granuleuse (stratum granulosum) est formée de deux à trois assises de cellules caractérisées par des granules de profilaggrine et de loricrine.

Enfin la couche cornée (stratum corneum) est constituée de cellules mortes kératinisées appelées cornéocytes. Cette couche est le siège d'une desquamation contrebalancée par le renouvellement opéré au sein de la couche basale (pour revue [2]).

Les protéines structurelles majeures présentes dans l'épiderme sont les kératines qui constituent le cytosquelette. La couche basale exprime les kératines K5 et K14 alors que la couche épineuse exprime les kératines K1, K2 et K10. Ces kératines sont connectées aux desmosomes et aux hémidesmosomes. Par leur intermédiaire, elles permettent la jonction des kératinocytes entre eux grâce aux cadhérines desmosomiales et l'ancrage de l'épiderme sur la membrane basale, par la connexion entre les intégrines $\alpha 6 \beta 4$ (contenu dans les hémidesmosomes) et la laminine 5. Ces connexions permettent à la peau d'avoir une grande résistance aux pressions extérieures tout en gardant une très bonne souplesse [3, 4].

La couche basale exprime majoritairement les kératines K5 et K14 (aussi K15 dans l'embryon) alors que la couche épineuse exprime les kératines K1 et K10. Chaque paire de kératines confère des propriétés mécaniques spécifiques adaptées aux cellules dans lesquelles elles sont exprimées [4, 3].

1.1.1.1.2 La membrane basale

L'épiderme et le derme sont séparés par la membrane basale composée de protéines, principalement le collagène IV, la fibronectine et la laminine 5. L'épiderme et le derme contribuent tous les deux à la synthèse des composants de la membrane basale, même si la couche basale de l'épiderme est plus particulièrement impliquée dans la synthèse du collagène IV et de la laminine 5.

1.1.1.1.3 Le derme

Le derme comprend le derme papillaire qui jouxte la jonction dermo-épidermique, le derme réticulaire et le derme profond. Son caractère conjonctif vient de sa composition. Ses cellules majoritaires sont les fibroblastes, qui déposent la matrice extracellulaire. Différents autres types de cellules sont présents dans le derme en plus des fibroblastes : nous retrouvons des lymphocytes, des mastocytes et des macrophages tissulaires. Cette matrice comprend des macromolécules de type protéique, en particulier fibres de collagène de type III, élastine et fibronectine conférant à la peau souplesse et élasticité, des mucopolysaccharides, sorte de gel dans lequel baignent les macromolécules. Ce gel est formé de glycosaminoglycanes, protéines qui vont capter l'eau dans le derme et ainsi agir comme réservoir d'hydratation. Le derme est irrigué et donc responsable de la nutrition de l'épiderme par diffusion.

Le derme papillaire tient son nom de sa surface en papilles qui forment des saillies alternant avec des prolongements épidermiques. Il a une structure fibreuse très fine, riche en cellules, en capillaires sanguins, en fibres nerveuses et en corpuscules tactiles. Le derme réticulaire, plus pauvre en cellules, est plus dense du fait de la présence de fibres de collagènes et de fibres élastiques. Le derme profond est composé de collagène. Il pénètre dans les tissus adipeux de l'hypoderme. Enfin l'hypoderme en

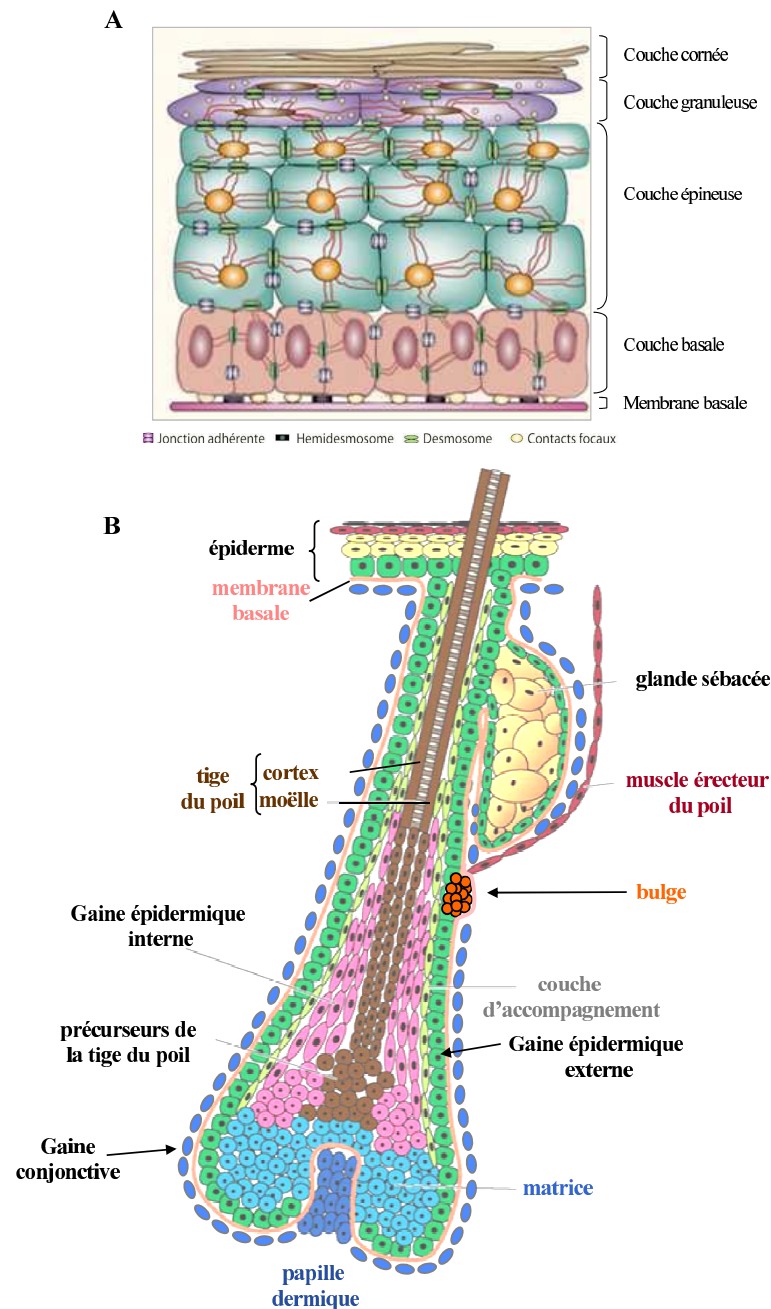


FIGURE 1.1 – La peau et le follicule pileux des mammifères

(A) La peau se compose de l'épiderme et du derme, séparés par une membrane basale. L'épiderme est un épithélium squameux stratifié que l'on peut subdiviser en plusieurs couches de cellules. Adjacent à la membrane basale il y a tout d'abord la couche basale (CB) comprenant de rares cellules souches et des cellules transientes, prolifératrices. Celle-ci donne les différentes couches de cellules qui se différencient progressivement vers la surface : La couche spineuse (CS), attenante à la couche basale, la couche granuleuse (CG) et la couche cornée ou stratum corneum (CC) (modifié d'après [5]).

(B) Le follicule pileux comprend la gaine externe (ORS), contigüe à la couche basale épidermique. A la base du follicule se trouve le bulbe pileux, constitué par les cellules prolifératrices de la matrice. Les cellules de la matrice génèrent les différents types cellulaires du follicule. Les cellules de la matrice forment des anneaux concentriques de cellules différenciées permettant la formation de la tige du poil, de la gaine interne du follicule (IRS) et de la couche d'accompagnement. Une invagination de l'ORS forme la glande sébacée. Le « bulge », qui est une partie de la gaine externe, est le lieu de résidence des cellules souches épidermiques. Les composants dermiques du follicule pileux sont la papille dermique et la gaine conjonctive (modifié d'après [2]).

profondeur est composé de tissus adipeux et conjonctif et a pour rôle de servir d'interface entre le derme et les structures mobiles situées en dessous de lui (muscles, tendons).

1.1.1.2 Les annexes cutanées

Il existe deux types d'annexes cutanées formées par l'épiderme : les phanères, kératinisés et apparaissant à la surface de la peau, poils et cheveux, griffes et ongles, et les glandes qui sont enfoncées dans le derme. Ces glandes sont développées et diversifiées chez les mammifères : les glandes mammaires, sébacées et sudoripares.

1.1.1.2.1 Les glandes sébacées

Les glandes sébacées sont associées au follicule pileux. Elles sont localisées au dessus du bulge et du muscle érecteur du poil (figure 1.1B). Ces glandes apparaissent à la fin de l'embryogenèse mais ne sont matures qu'après la naissance. Ce sont des glandes exocrines tubulo-alvéolaires à sécrétion holocrine. Leur portion sécrétrice, constituée, par des kératinocytes particuliers, les sébocytes, produit le sébum, composé de lipides. Les glandes sébacées sont associées étroitement au follicule pileux avec lequel elles forment le complexe pilo-sébacé. Le canal excréteur, bordé d'un épithélium malpighien, déverse le sébum au niveau de l'isthme des follicules pilo-sébacés [6, 7].

1.1.1.2.2 Les glandes sudoripares

On distingue deux grands types de glandes sudorales : les glandes eccrines dont la sécrétion se fait sans perte de matériel cytoplasmique et les glandes apocrines dont la sécrétion se fait par décapitation du pôle apical cellulaire. Les glandes eccrines jouent un rôle fondamental dans la thermorégulation et la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique. Elles se répartissent sur presque toute la surface corporelle et se composent d'un peloton sudoral, d'un tubule excréteur dermique rectiligne et d'un acrosyringium, structure hélicoïdale unique. Les glandes apocrines sont moins nombreuses que les glandes eccrines et ne s'observent que dans les creux axillaires et les régions périnéale, ombilicale et aréolaire. La fonction de leur sécrétion odorifère est méconnue. Un troisième type de glandes sudorales, dénommées apoecrines, de morphologie intermédiaire, a été récemment découvert sur des pièces opératoires axillaires. En pathologie, les glandes sudorales peuvent être impliquées dans des processus inflammatoires ou tumoraux [8].

1.1.1.2.3 Les glandes mammaires

Les glandes mammaires exocrines sécrétant du lait, sont au nombre de 5 à 6 paires chez la souris. Elles sont identifiables par une ligne apparaissant sur la face ventrale de l'embryon de souris à 10,5 de gestation à la surface de l'épiderme. Cette crête mammaire ou ligne lactéale se scinde ensuite en paires symétriques de bourgeons mammaires primitifs. Les bourgeons épithéliaux s'invaginent en profondeur

dans le derme, puis dans le tissu hypodermique. Ces structures se ramifient et se creusent pour constituer les futurs canaux galactophores. Le tissu conjonctif se densifie autour de ces ébauches et des cellules musculaires apparaissent sous la plaque aréolaire [9].

1.1.1.2.4 Les follicules pileux

Chez la souris, il existe deux types de follicules pileux : les follicules du pelage, qui sont répartis sur l'ensemble du corps et les vibrisses, organes sensitifs situés principalement au niveau de la lèvre supérieure du museau. Tout follicule pileux différencié (figure 1.1B) est constitué de trois parties principales. Le bulbe est constitué à sa base d'une partie renflée comprenant la matrice pileuse qui encapsule la papille dermique. Il se termine au niveau de l'insertion du muscle érecteur du poil. L'isthme est la partie comprise entre l'insertion du muscle pilo-érecteur et l'association de la glande sébacée annexée au poil. L'infundibulum pileux, partie superficielle la plus distale est en continuité directe avec l'épiderme interfolliculaire. L'isthme et l'infundibulum forment la partie du follicule dite permanente, car elle reste inchangée durant le cycle du poil, alors que la partie proximale du follicule pileux va disparaître de façon cyclique [10]. Le follicule pileux est formé de compartiments parfaitement individualisés : les uns d'origine dermique (gaine conjonctive et papille dermique), les autres de nature épithéliale (gaine épithéliale externe, gaine interne, tige pileuse et glande sébacée) (figure 1B). La gaine conjonctive est traversée, dans le tiers inférieur, par un fin réseau de capillaires sanguins, elle se prolonge à la base du follicule par la papille dermique. Le compartiment épithélial peut, quant à lui, être séparé en quatre domaines distincts. À la base du follicule et entourant la papille dermique se trouve la matrice, siège de l'activité mitotique. Cette matrice produit, avec des programmes de différenciation spécifiques, les trois grands domaines concentriques que sont la gaine épidermique externe du follicule (ORS-Outer Root Sheath), la gaine épidermique interne (IRS-Inner Root Sheath) et la tige pileuse. La gaine interne est elle-même formée de trois couches concentriques (couche de Henle (la plus externe), couche de Huxley et cuticule), tout comme la tige pileuse (cuticule, cortex et médulla). Chacun de ces domaines expriment des marqueurs spécifiques [11, 10].

La mise en place de la peau et de ses annexes implique des mécanismes complexes tout au long de la morphogénèse. Je vais d'abord décrire les étapes importantes de la formation du follicule pileux, et puis aborder le contrôle génétique du cycle pileux.

1.1.2 Formation et maintien du follicule pileux

1.1.2.1 Morphogénèse du complexe pilo-sébacé

Le développement du follicule pileux résulte d'une série d'interactions entre l'épiderme et le derme au cours du temps [12] (figures 1.2 & 1.3). Pour commencer, un signal dermique ubiquitaire de type Wnt induit l'apparition de placodes dans l'épiderme. En réponse, l'épiderme transmet alors un signal

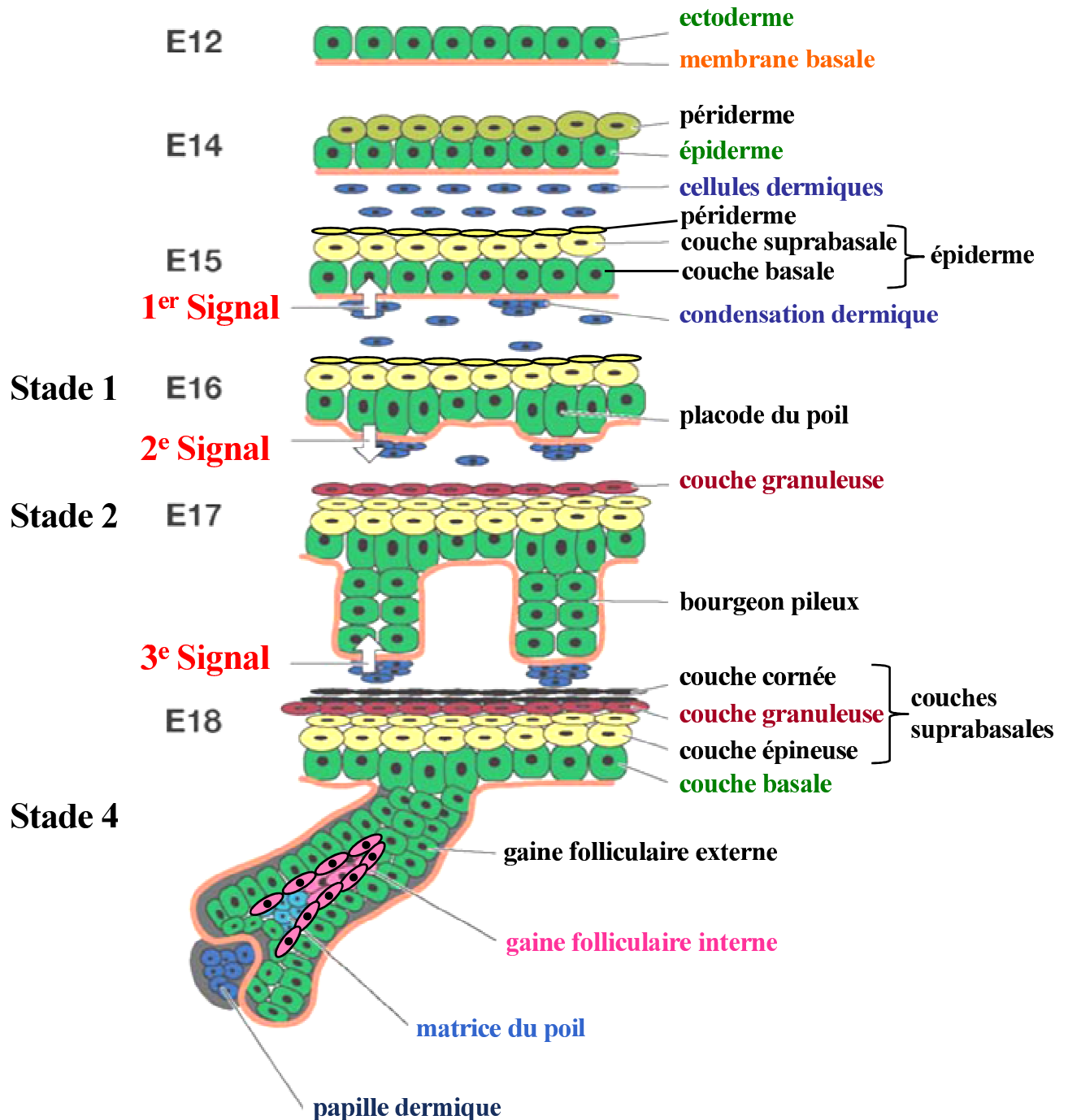


FIGURE 1.2 – Le développement épidermique et la morphogénèse du bourgeon pileux

La surface de l'embryon est recouverte d'une simple couche de cellules ectodermiques joint à la membrane basale sous-jacente. En réponse à la constitution du derme, l'ectoderme se divise et donne le périderme en surface et l'épiderme. Au cours du développement, l'épiderme va progressivement se stratifier et le périderme va être exfolié. Durant le développement embryonnaire, de façon périodiques, des cellules basales sont sollicitées par le derme sous-jacent (*1^{er} signal*) et adopte une destinée de follicule pileux. Elles forment les placodes. En réponse, la placode envoie un message au derme (*2^{ème} signal*) pour induire la papille dermique (DP). Enfin, la DP envoie à son tour un signal au follicule en développement (*3^{ème} signal*), lui permettant de croître et de se différencier [12]. Les jours de gestation sont indiqués (E12 à E18) (Modifié d'après [2]).

aux cellules du derme sous-jacent afin de se regrouper en condensation (figure 1.2). Celle-ci donnera ultérieurement la papille dermique (DP) et la gaine conjonctive. Ensuite un deuxième groupe de signaux provient de la papille et déclenche la différenciation de l'annexe épidermique.

Le processus de morphogenèse du follicule pileux se divise en 9 grandes étapes. [13, 10, 2].

- **Stade 0** : aussi appelé le stade pré-germinal. A ce stade, en dessous de l'épiderme se trouve une couche régulière de cellules dermiques (figure 1.2).
- **Stade 1** : la formation de la placode commence dans l'épiderme. Elle entraîne celle de la condensation dermique qui, à son tour, induit la formation du primordium pileux.
- **Stade 2** : la placode se développe en un bourgeon pileux qui s'enfonce dans le derme. Une orientation antéro-postérieure et proximo-distale devient distincte.
- **Stade 3** : l'extrémité proximale encapsule la papille dermique qui devient distincte de la gaine conjonctive (figure 1.3).
- **Stade 4** : le premier signe d'organisation morphologique de la gaine interne du follicule (IRS) apparaît sous la forme d'un cône de cellules, au-dessus de la matrice folliculaire et sépare les kératinocytes restants en populations distinctes : la gaine externe (ORS) et la tige du poil.
- **Stade 5** : les premiers sébocytes, précurseurs de la glande sébacée, apparaissent sous la forme d'un bourgeon de la gaine épithéliale externe, au dessus de l'insertion du muscle du poil. Les premiers granules de mélanine apparaissent dans la région du cône de l'IRS, qui s'allonge vers la surface de l'épiderme. Enfin une partie renflée de la partie proximale de l'ORS deviendra le bulge.
- **Stade 6** : l'IRS, formée de trois couches, s'étend jusqu'au niveau du canal pileux, maintenant visible. Les sébocytes forment la glande sébacée et les granules de mélanine sont visibles au niveau proximal de la tige du poil.
- **Stade 7** : le bout de la tige du poil quitte l'IRS et entre dans le canal pileux au niveau de l'infundibulum.
- **Stade 8** : le follicule pileux (bulbe et papille folliculaire) acquiert sa longueur maximale et s'ancre près de la couche musculaire sous-cutanée (panniculus carnosus) pour finalement émerger à la surface de l'épiderme. Le follicule pileux est mature.

La morphogenèse du follicule pileux qui débute durant l'embryogenèse, se poursuit après la naissance pour former chez la souris un follicule mature et un poil qui émerge de la peau après environ 15 jours *post-partum*. Dans le chapitre suivant, nous allons voir comment se renouvelle d'un point de vue morphologique le follicule pileux chez l'adulte.

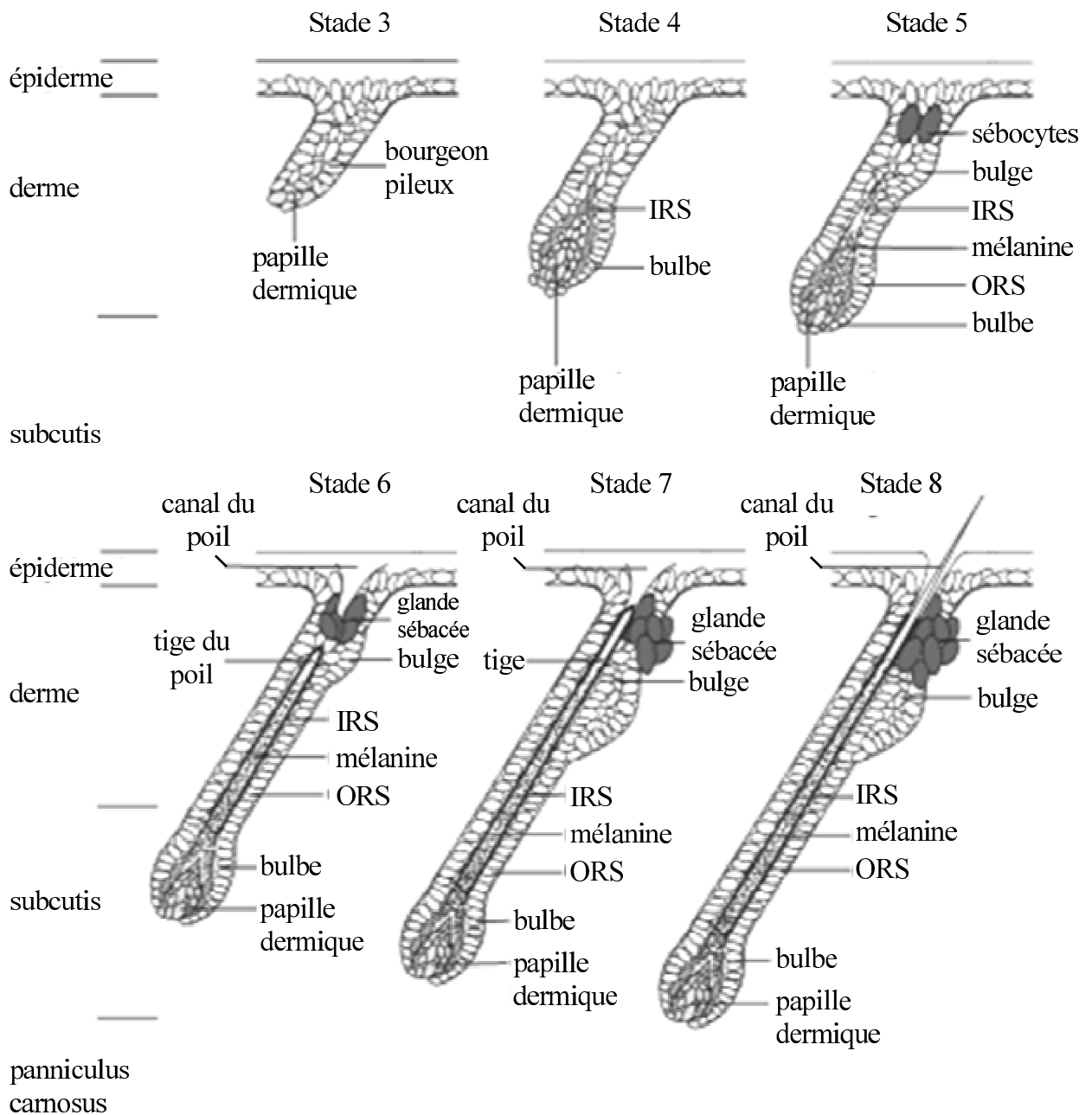


FIGURE 1.3 – Du bourgeon pileux au follicule pileux lors de la vie foetale

Stade 3 : les cellules de la placode prolifèrent et migrent progressivement en direction des couches profondes du derme. Stade 4-5 : les cellules épithéliales de l'extrémité proximale du bourgeon s'organisent pour former une cavité à l'intérieur de laquelle s'engouffrent progressivement les cellules de la condensation dermique. Les cellules de l'IRS s'individualisent. Stade 5-8 : les kératinocytes du bourgeon de follicule pileux s'organisent en plusieurs couches concentriques, enroulées autour de l'axe folliculaire, pour former le follicule mature, le bulge et la glande sébacée s'organisent.

1.1.2.2 Le cycle du poil

Le cycle du poil comprend trois étapes importantes qui ont chacune un rôle bien précis. La première, la phase anagène correspond à une phase de naissance et de production de la tige pileuse. Elle se déroule entre le 1^{er} et le 16^{ème} jour post partum, chez la souris, et correspond aux stades 5 à 8 décrits précédemment. Au cours de l'anagène le follicule pileux s'allonge dans le derme pour atteindre une longueur maximale au niveau du panniculus carnosus (PC). Cette étape est suivie par une involution, la phase catagène, caractérisée par une régression du poil. Elle commence au 17^{ème} jour chez la souris et ne dure que quelques jours. Enfin la troisième et dernière étape, la phase télogène, correspond à une phase de repos. A ce moment le poil reste ancré dans le follicule, sans croître d'avantage pour finalement se détacher et tomber à la fin du cycle. Le follicule va ensuite entrer dans un nouveau cycle [14].

Dans le paragraphe suivant je vais décrire ces différentes phases, puis m'intéresser rapidement au contrôle moléculaire du cycle pileux, pour finalement détailler les processus au niveau des cellules souches du bulge qui permettent le renouvellement constant du poil.

1.1.2.2.1 Le stade anagène

Une fois le follicule constitué, les cellules de la matrice à la base du follicule continuent à proliférer et à se différencier. Cette forte période d'activité est connue sous le terme de phase anagène. Cette phase est la plus longue du cycle (figure 1.4). Elle se déroule en plusieurs étapes (Anagène I-VI) qui sont caractérisées par une intense croissance de la partie proximale du follicule vers les couches profondes sous-cutanées, associée à la fabrication d'un nouveau poil.

Durant la phase anagène I, le follicule pileux est entièrement entouré par le derme. En comparaison, la phase anagène II est caractérisée par une papille dermique qui s'allonge et qui est partiellement enveloppée par les kératinocytes de la matrice du poil. La papille et le bulbe sont localisés à la bordure entre le derme et le tissu sous-cutané. La phase anagène III peut être sous divisée en 3 étapes (a, b et c) très distinctes les unes des autres. Dans la phase anagène IIIa, le bulbe et la papille dermique résident en bordure entre le derme et le tissu sous-cutané. Le cône de la gaine interne du follicule (IRS) se développe au dessus de la papille et des granules de mélanines apparaissent. Une couche de kératinocytes différenciés remonte de la partie distale de la matrice du poil et devient visible comme une structure à part entière. Aucune tige du poil n'est visible à ce moment là, sa formation ne commencera qu'à la fin de la phase anagène IIIa. Une tige de poil en développement devient clairement visible à partir de la phase anagène IIIb. Elle monte à partir du milieu du follicule pileux et est entièrement entourée par l'IRS, laquelle contient maintenant les trois couches qui la caractérisent (couche de Henle, couche de Huxley et la cuticule). Le cône distal de la gaine interne s'élève aux deux tiers de la longueur du follicule pileux jusqu'au niveau de l'insertion du muscle érecteur et de la glande sébacée. Le bulbe est maintenant plus large et entoure quasi-complètement la papille dermique élargie. Cette même papille dermique commence à perdre de la

consistance. Pendant la phase anagène IIIb le bulbe et la papille résident au milieu du tissu sous-cutané. Pendant la phase anagène IIIc, le bulbe et la papille vont s'étendre plus profondément et venir se positionner près du panniculus carnosus dans le tissu sous-cutané. La tige du poil s'élève juste au dessus de la glande sébacée mais ne sort pas du canal pileux. La gaine externe et la gaine interne du poil sont maintenant clairement distinctes. Comparée à l'anagène IIIb, la papille dermique est maintenant plus mince et plus allongée. Elle continue à perdre de la consistance et n'est pas encore complètement entourée par les kératinocytes du bulbe pileux. En anagène IV, le bulbe et la papille sont encore dans le tissu sous-cutané. Le côté le plus distal de l'IRS et le cône de la tige du poil sont attachés au canal pileux. La phase anagène V, de même qu'à l'étape précédente, est une phase très courte. Elle se distingue facilement par le fait que la tige du poil entre dans le canal pileux. La dégradation de l'IRS, qui dégage la tige du poil, commence au niveau de l'insertion de la glande sébacée. A partir du moment où la pointe de la tige du poil émerge au travers de l'épiderme, le follicule pileux entre dans la phase anagène VI et termine sa croissance [15].

1.1.2.2.2 Le stade catagène

Une fois le stade anagène terminé, le follicule pileux entre dans la phase catagène. Il s'agit d'une phase de régression. Elle est assez courte, et ne dure que quelques jours chez la souris. Elle se compose de huit étapes distinctes au cours desquelles il se produit un raccourcissement progressif de la partie proximale du follicule pileux, associé à une intense activité apoptotique dans la zone de la matrice du poil (figure 1.4).

On distingue très difficilement la phase catagène I de la phase anagène VI. Il n'y a pas d'altérations de taille ou de longueur du follicule pileux. Seul un nombre plus important de cellules apoptotiques ont pu être observées au niveau du bulbe, par microscopie électronique. Durant la phase catagène II, le follicule a toujours la même longueur mais le bulbe est plus petit et la papille plus étroite. Au cours de la phase catagène III le bulbe est de plus en plus petit et n'est englobé que par la moitié de la papille dermique. Pendant l'étape catagène IV, le follicule est encore plus réduit, l'enveloppe de la papille devient compacte et le bulbe a tendance à se rétracter. Au moment du stade catagène V, l'ORS forme une capsule autour du bulbe du poil. La partie du follicule située en dessous de cette capsule s'atrophie de sorte qu'au stade catagène VI, la papille dermique ne semble plus reliée à la capsule que par un mince cordon d'une épaisseur de 2 à 3 couches de cellules épithéliales. Au stade catagène VII, la partie proximale du follicule continue de se rétracter jusqu'à ce que la capsule épidermique ait atteint le niveau du tissu sous-cutané. La papille dermique ne reste pas enfouie dans le derme mais accompagne le follicule dans sa rétraction grâce au cordon de cellules épithéliales qui la relie à la capsule épidermique. Le paramètre clé de cette phase est en effet le mouvement vers le haut de la papille dermique qui laisse derrière elle une longue trace de fibroblastes de la gaine de tissu conjonctif [16, 17]. Enfin, au stade catagène VIII, le follicule apparaît raccourci au maximum. L'extrémité proximale du bulbe du poil se localise en dessous

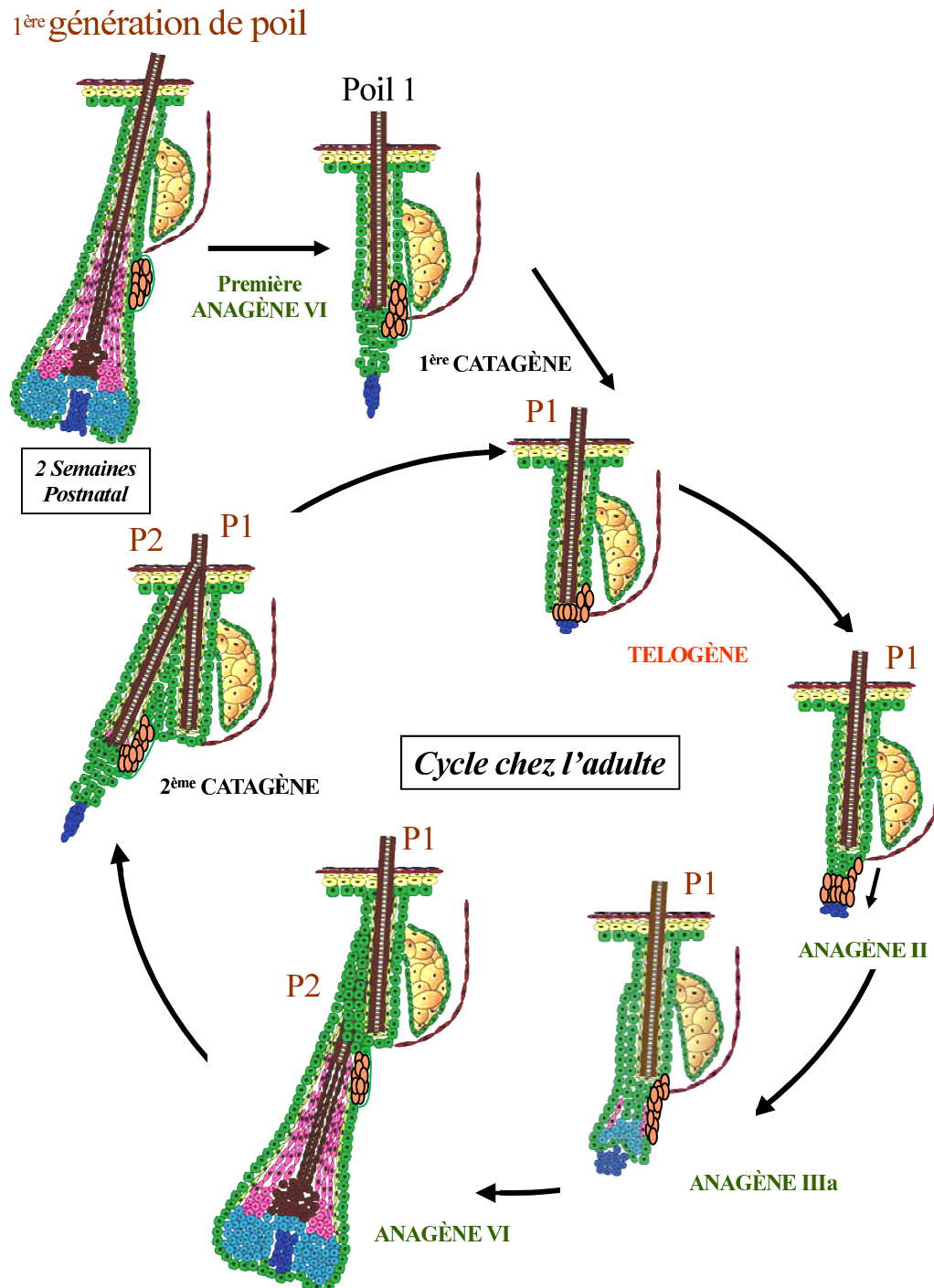


FIGURE 1.4 – Le cycle du poil

Quand les cellules de la matrice épuisent leur capacité proliférative ou les stimuli nécessaires pour les activer, la pousse du poil s'arrête. A ce moment, commence une phase de destruction (la phase catagène) qui mène à la dégénération du follicule sur les deux tiers de sa partie distale. Le dernier tiers restant du follicule reste intact et forme une capsule de cellules entourant la vieille tige du poil. A la base de cette capsule se trouve le bulge, réservoir de cellules souches du follicule pileux. Après la phase catagène, le follicule entre dans une phase quiescente, la phase télogène. C'est pendant cette phase que la papille dermique se trouve en contact intime avec les cellules souches du bulge. Après cette phase de repos, un nouveau cycle pileux s'amorce et le follicule entre à nouveau dans une période de croissance, la phase anagène. C'est à partir des cellules du bulge que se reforme le follicule pileux. La deuxième génération de poil (P2) émerge, alors que la première génération (P1) n'est pas encore tombée (modifié d'après [2]).

des glandes sébacées, alors que la papille dermique s'arrête dans sa migration et reste localisée au niveau de la frontière entre le derme et le tissu sous-cutané [15].

1.1.2.2.3 Le stade télogène

A l'issue du stade catagène VIII, le follicule entre dans la phase télogène, dite phase de repos. Cette étape dure environ 1 semaine chez la souris. Au cours du télogène, le bulbe pileux se détache de la papille folliculaire et on observe généralement l'expulsion définitive de la tige du poil (figure 1.4). A l'issue de cette phase, un nouveau cycle peut reprendre.

1.1.2.2.4 Le cycle du poil au niveau moléculaire

Plusieurs régulateurs moléculaires de l'induction de l'anagène et de la transition anagène – catagène ont été identifiés. Parmi eux figurent les ligands, les récepteurs et les effecteurs des grandes voies de signalisations Wnt, Shh, BMP et FGF. Pour le moment les mécanismes précis par lesquels ils permettent de promouvoir la régénération et la dégénérescence du poil n'ont pas été élucidés. La dynamique de fonctionnement implique l'existence d'une horloge biologique interne au follicule, parfaitement régulée et capable de contrôler de profonds remaniements cellulaires. Cela exige également l'existence d'un « pool » de cellules multi-potentes ou cellules souches, capables d'être activées périodiquement pour induire la croissance d'un nouveau poil. Ces cellules interviendraient également pour régénérer l'épiderme dans le cas de traumatismes cutanés. La recherche concernant ces cellules souches a été particulièrement dynamique ces dernières années et l'on commence à connaître un peu mieux leur nature, leur localisation ainsi que leurs propriétés.

1.1.2.3 Les cellules souches du tégument

La peau et les follicules pileux, contrairement à d'autres organes, ont la capacité de se renouveler tout au long de la vie. Ce renouvellement physiologique peut s'accroître dans le cas de blessures ou de brûlures. Cette capacité de régénération implique l'existence d'un réservoir de cellules souches. Ces recherches sont extrêmement importantes pour la thérapie génique. Très récemment une équipe de Villejuif a fait une avancée significative dans ce domaine. Lorsque l'on fait une greffe des cellules souches modifiées il arrive très souvent qu'elles soient rejetées par l'organisme, à cause du gène de résistance qu'elles contiennent, utilisé pour leurs sélections lors de leur « correction » ectopique. Grâce à l'ajout d'un marqueur CD24, petite protéine présente à la surface des kératinocytes suprabasaux, plutôt qu'un gène de résistance, les cellules souches sont reconnues comme des kératinocytes différenciées et ne subissent plus de rejets [18].

1.1.2.3.1 Mise en évidence

Il existe deux types de cellules souches dans la peau. Celles situées dans l'assise basale de l'épiderme et celles situées dans la gaine externe du follicule. L'existence des cellules souches épidermiques a été démontrée dans les années 70 [19, 20].

Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'identifier les cellules souches adultes (pour revue [21]). La première à avoir été mise en oeuvre met en avant la nature des cellules souches concernant leur cycle de division extrêmement lent. Dans une expérience de « pulse-chase », toutes les cellules d'un tissu qui se divisent incorporent un analogue de nucléotides (comme le BrdU ou la thymidine tritiée) dans l'ADN nouvellement synthétisé. Seules les cellules ayant un temps de renouvellement très long vont garder l'analogue incorporé, toutes les autres cellules vont le perdre progressivement. Les cellules capables de retenir longtemps le marquage ont été nommées LRC pour Label Retaining Cells [22, 23]. Une autre méthode consiste à marquer, par un rétrovirus porteur de la β -galactosidase par exemple, une population de cellules et de les utiliser pour reconstituer un tissu épidermique *in vivo*. Le tissu marqué est alors greffé à des souris et la peau nouvellement reconstituée va ensuite exprimer des gènes rapporteurs incorporés. Au final une colonne de cellules clonales apparaît exprimant le marqueur. Il suffit ensuite de calculer la taille de la colonne en comparaison avec la taille du reste du tissu pour évaluer la quantité de cellules souches présentes dans l'assise basale et capables de générer une population clonale [24].

Dans les années 90, des chercheurs montrèrent que la majorité des LRC dans la peau étaient situées dans la région du bulge du follicule pileux, avec une petite fraction dans la couche basale de l'épiderme inter folliculaire [25, 26]. Chez l'homme plus de 95% des LRC ont été identifiées dans le bulge, les 5% restant étant dans la matrice du poil. De nombreux travaux montrent que ces cellules du bulge sont multipotentes. En effet, une fois isolées par dissection, mises en culture puis transplantées chez une souris athymique, elles sont capables de former un épithélium stratifié [27, 28]. Si l'on transplante des cellules du bulge exprimant le marqueur de la β -galactosidase, au niveau de la région du bulge de souris receveuses, ces cellules colonisent tous les compartiments épithéliaux du follicule, y compris les glandes sébacées et l'épithélium inter folliculaire [29].

Afin de s'affranchir des marqueurs utilisés précédemment et grâce à l'utilisation d'une technique puissante, le FACS, l'inventaire des marqueurs moléculaires qui caractérisent les cellules souches de la couche basale de l'épiderme et du bulge a commencé. Ces marqueurs peuvent être classés en deux catégories. Des marqueurs positifs comme l'intégrine $\beta 1$, l'intégrine $\alpha 6$, la cytokératine 15, le CD34, le protéoglycane NG2/MCSP ou la phospholipase $C\delta$ sont exprimés dans différents compartiments cellulaires, principalement sur les membranes cellulaires des cellules souches putatives et permettent de distinguer et de trier ces cellules à partir d'échantillons tissulaires [30, 31, 32]. D'autre part, les cellules souches sont parfois caractérisées par l'absence spécifique de certaines molécules. Ces molécules comme la connexine 43 ou le CD71 fonctionneraient comme des marqueurs négatifs qui permettraient également

l'identification, la sélection et l'enrichissement des colonies expérimentales de cellules souches cutanées [33]. Malgré l'élégance de ce triage par FACS basé sur des marqueurs spécifiques, l'identification de cellules souches reste délicate et la purification de leurs populations est très souvent insatisfaisante.

1.1.2.3.2 Les cellules souches du follicule pileux

Il était communément admis que les cellules souches du follicule pileux permettant la régénération du poil étaient localisées dans deux régions principales du follicule pileux [34]. L'une des populations de cellules souches putatives résident exclusivement dans le « germe secondaire », qui est localisé à la base du follicule en phase télogène. Ce germe descend pendant la phase anagène et fournit les nouvelles cellules nécessaires à la production du poil. Ensuite, pendant la phase catagène, le germe secondaire remonte avec la papille dermique et revient à la base du follicule pendant la télogène. Ce scénario a été soumis à de nombreuses questions lorsque des chercheurs ont finalement identifié une population de cellules LRC, présentes dans la région du bulge, juste en dessous de la glande sébacée [25] (figure 1.5). Ces deux points de vue ont été réconciliés par des études récentes qui ont permis de montrer que sous l'effet de signaux moléculaires encore mal définis entre ces deux parties du follicule pileux, une migration des cellules du bulge s'opère, permettant à la papille dermique d'entrer en contact avec la région du bulge, contenant le pool de cellules souches. Ces cellules quittent la niche et partent coloniser le bulbe naissant. Une nouvelle matrice sera ainsi formée à la fin du stade télogène. C'est cette nouvelle matrice du poil qui sera à l'origine de la prochaine tige et de ses gaines épithéliales externe et interne [35].

Les cellules du bulge, pouvaient elles aussi permettre de maintenir l'homéostasie de l'épiderme ? Comme une ablation du bulge n'entraîne pas la perte de l'épiderme, il a été conclu que l'épiderme est seul responsable de son maintien continu ou homéostasie [36, 37]. L'hypothèse que les cellules du bulge fournissent continuellement des cellules progénitrices permettant de repeupler l'épiderme [38, 34, 39] a été graduellement abandonnée (figure 1.5). Pourtant les cellules du bulge sont recrutées lors de blessure à l'épiderme [40, 36, 39, 35]. Ainsi ces cellules sont stimulées pour migrer dans l'épiderme en suivant l'incision de la blessure. Au moins 25% du nouvel épiderme proviendra des cellules du bulge. Fait intéressant cependant, malgré la présence de cellules dérivées du bulge dans la couche basale de l'épiderme nouvellement synthétisé, la majorité de ces cellules ne persisteront pas dans l'épiderme régénéré final [36] (figure 1.5).

Tous ces résultats sur la multi-potence des cellules souches du bulge ainsi que les expériences montrant une migration de ces cellules vers la partie distale du follicule confirment l'idée selon laquelle les cellules du bulge et ses progéniteurs seraient directement impliqués dans l'induction et la croissance d'un nouveau poil à l'issue du stade télogène. Actuellement l'idée d'une « prédétermination du follicule pileux » [34] est la plus forte. Selon cette théorie, seule la gaine épithéliale externe proviendrait des dérivés des cellules souches du bulge tandis que la tige du poil et les différentes couches de la gaine épithéliale

interne proviendraient des cellules appelées « cellules germinatives du poil ». Ces cellules germinatives seraient produites durant le stade anagène du cycle du poil. A chaque cycle précédent, quelques cellules du bulge, appelées les cellules TA (Transient Amplifying cells) migreraient vers la partie distale du follicule pileux. Ces cellules « amplifiées » de façon transitoire resteraient localisées ensuite au niveau d'un des bords inférieurs de la gaine épithéliale externe du bulge pour former un « disque latéral » (DL). Pendant le stade catagène, les cellules de ce disque échappent à la voie apoptotique et viennent directement en contact avec les cellules de la papille folliculaire. Ce contact rapproché entre les cellules du disque et la papille provoquerait un retour des cellules TA en cellules souches, dites germinatives. Ces cellules, au cours du stade anagène suivant, participeraient à la formation de l'IRS et de la tige du poil tandis que des cellules du bulge quitteraient leur niche pour former l'ORS [34].

Au niveau moléculaire, toutes ces études ont énormément contribué à la recherche d'une « signature moléculaire » spécifique des cellules souches. Parmi les gènes candidats à conférer cette qualité de « souchitude » figurent des facteurs de transcription (*Oct4*, *Sox2*, *Tcf3*), des membres des voies Wnt et TGF, des protéines d'adhésion cellulaire (diverses intégrines) et des effecteurs du cycle cellulaire. L'ensemble de ces différents facteurs contrôlerait la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches [41, 42, 35].

A l'heure actuelle, nous commençons à peine à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la multi-potence des cellules souches épidermiques d'un organe adulte. Il n'en reste pas moins important d'élucider les circuits d'interactions entre les voies de signalisation et les facteurs de transcription qui dirigent la formation et la différenciation du follicule pileux. La mise en place et le maintien de ces follicules est le résultat d'un ensemble de processus subtils faisant intervenir à chaque étape de profonds remaniements cellulaires finement régulés (pour revue [43]). La morphogenèse du poil est le fruit d'un dialogue permanent entre le derme et l'épiderme, qui implique un réseau de communications épithélio-mésenchymateuses et qui est gouverné par des interactions géniques entre les grandes voies de signalisation intercellulaire et les facteurs de transcriptions spécifiques du tissu. Ainsi le prochain paragraphe détaillera les réseaux moléculaires responsables de l'induction du follicule pileux.

1.2 Dialogues moléculaires au cours du développement du follicule pileux

Le développement du follicule pileux peut se diviser en trois étapes distinctes : L'induction, l'organogenèse et la cyto-différenciation. La polarité spatiale et les patterns de différenciation du follicule sont dirigés par les interactions entre des gradients de molécules activatrices et inhibitrices, lesquels sont conjointement établis par l'épiderme et le derme. Pour que le développement du follicule ait lieu, l'influence d'inhibiteurs de la différenciation du follicule doit être contrée localement par des antagonistes spécifiques comme des molécules stimulatrices de la formation de la placode dermique. Une fois que la condensation mésenchymateuse, composée de fibroblastes, a été formée, les étapes d'organogenèse et de

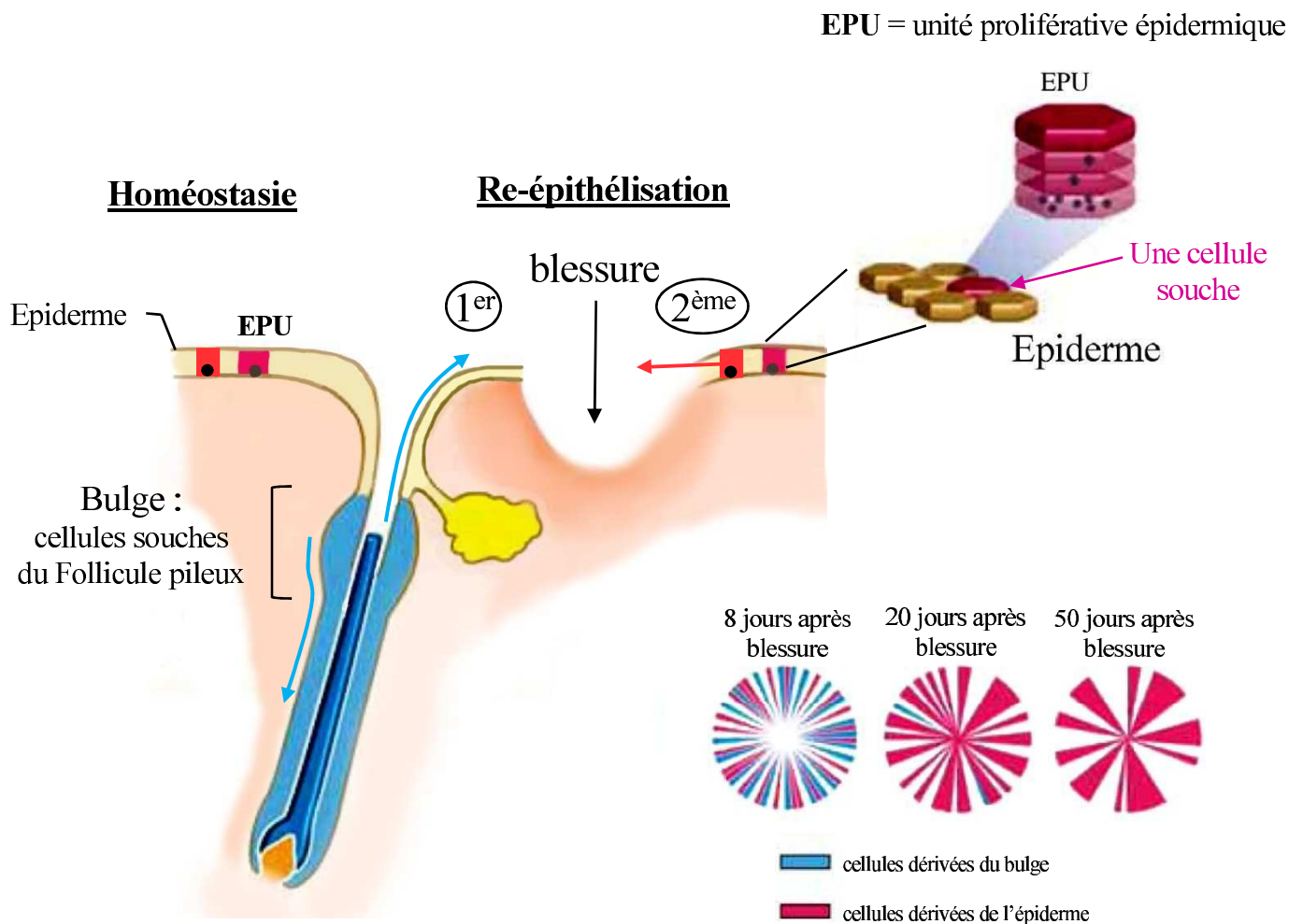


FIGURE 1.5 – Rôles des cellules souches du bulge et de l'épiderme pendant l'homéostasie et après une blessure

En condition d'homéostasie, le renouvellement épidermique dépend de la prolifération des cellules souches épidermiques. Une cellule souche donne une unité proliférative épidermique (EPU). Les cellules du bulge régénèrent le nouveau follicule (flèche bleue descendante) mais ne contribuent pas au renouvellement épidermique. Après une blessure, quelques cellules du bulge (réservoir de cellules souches) migrent immédiatement pour participer à la régénération de l'épiderme (flèche bleue montante) avec les cellules souches épidermiques adjacentes (flèche rouge). Quelques temps après, les cellules dérivées du bulge disparaissent de l'épiderme. Seules les cellules dérivées des cellules souches épidermiques restent présentes (modifié d'après [43]).

différenciation prennent le contrôle. Il y a alors apparition de plusieurs lignées cellulaires distinctes.

Dans ce chapitre je vais tout d'abord détailler la formation de la placode et du bourgeon pileux d'un point de vue cellulaire, avant de m'attarder sur les différentes voies de signalisation ayant un rôle dans le cycle de poil tout au long de son existence.

1.2.1 Formation de la placode et du bourgeon pileux

La formation du follicule pileux commence durant l'embryogenèse et dépend d'une série de signaux échangés par les cellules dermiques et les cellules épidermiques. Le point culminant de ce dialogue sera la différenciation des cellules en tige du poil, en gaines épithéliales et en papille dermique. L'existence de ces signaux a été découverte par des expériences dans lesquelles du derme et de l'épiderme d'origine différente ont été recombinaisonnés ensemble à différents stades de l'embryogenèse [12]. Il fut ainsi découvert qu'un premier groupe de signaux partait du derme, entraînant dans l'épiderme la formation d'épaississements espacés de façon régulière, appelés placodes. Ce signal fut appelé « premier signal dermique ». Suite à cela, une réponse venant de la placode nouvellement formée, appelé « signal épithélial », permet la formation de la condensation dermique. Cette condensation représente l'agrégation d'un groupe de cellules sous-jacentes dans le derme. A partir de ce moment, un troisième message, en provenance des condensations, provoque la prolifération puis la différenciation des cellules de la placode [12, 44]. Etant donné que la communication entre les différents types de cellules est extrêmement importante pour le développement du follicule, cela implique que les signaux moléculaires jouent un rôle central dans ces processus. Plusieurs approches ont été mises en place pour identifier ces molécules et notamment leurs effecteurs, leurs cibles et les voies de signalisation dans lesquelles elles pourraient jouer un rôle. Même si plusieurs voies ont été découvertes (pour revue [45]), un certain nombre de signaux clés régulant la formation du follicule sont encore inconnus ou partiellement caractérisés.

1.2.1.1 Le premier signal dermique

A l'heure actuelle, le premier signal dermique n'a pas encore été caractérisé et son mode d'action reste un sujet de spéculation. Plusieurs études ont été réalisées chez l'embryon de poulet, notamment sur la formation des placodes plumaires. Un premier modèle a été proposé pour comprendre comment le signal dermique opérerait. Selon ce modèle l'espacement et la taille des placodes seraient régulés par un signal dermique périodique, qui varierait suivant les régions du corps. Pour tester cette hypothèse les condensations dermiques ont été marquées avec un marqueur lipophile et le derme et l'épiderme dissociés en cellules isolées en suspension. Une fois recombinaisonnées ensemble, ces cellules ont été à l'origine de la formation d'une placode, mais comme les cellules marquées se répartissaient en désordre entre condensation dermique et le derme interfolliculaire, leur position initiale ne permettait pas de déterminer leur capacité à induire une placode [46]. Ce résultat a permis de rejeter l'idée d'un signal dermique

périodique. Dans un modèle alternatif le signal dermique arrive uniformément dans chaque région du corps et déclenche l'activation des promoteurs et répresseurs de la formation du follicule entraînant une compétition entre eux (figures 1.6 & 1.7). Un plan régulier de placodes se met alors en place [47]. Des nuances entre les niveaux des activateurs et des inhibiteurs pourraient être à l'origine des différences entre toutes les parties du corps, notamment au niveau de l'espacement et de la taille du follicule. En accord avec ce modèle, plusieurs molécules régulatrices ont été découvertes s'exprimant de façon uniforme dans l'épiderme puis se localisant spécifiquement à la placode.

Un premier indice de la nature moléculaire du signal dermique est venu d'études concernant la localisation subcellulaire de la β -caténine. Cette molécule est rapidement dégradée dans le cytoplasme. En réponse à l'action d'un signal intercellulaire de la molécule Wnt, cette dégradation est inhibée. Dans ces circonstances la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau où elle forme des complexes transcriptionnels actifs avec les facteurs Lef/Tcf (figure 1.8) [48]. Cette signalisation est spécifiquement activée dans le mésenchyme lors du développement des vibrisses de souris et serait à l'origine de l'initiation de la formation de la placode des vibrisses [49, 50, 51].

En résumé, l'activation de la voie de signalisation des Wnt dans le derme pourrait être impliquée dans l'établissement du premier signal dermique. De plus la répartition uniforme de la β -caténine au sein du derme corrobore l'hypothèse selon laquelle le premier signal dermique serait uniforme. Une fois activé par le signal Wnt, la β -caténine s'accumulerait au niveau des territoires présomptifs des placodes.

1.2.1.2 La formation des placodes

A la suite de ce premier signal dermique, des groupes de cellules épidermiques vont proliférer et pénétrer au niveau du derme pour former une placode épidermique. Les études fonctionnelles et descriptives, chez la souris (et chez le poulet), montrent qu'en réponse à ce premier signal dermique, plusieurs classes de molécules de signalisation sont exprimées dans l'épithélium folliculaire (figures 1.6 & 1.7). Pour l'instant la cascade d'événements précis n'est pas encore bien connue. Ce premier signal dermique entraîne la mise en place d'un nombre accru de molécules, dont voici un rapide descriptif.

1.2.1.2.1 La voie de signalisation des Wnt

Plusieurs molécules de la famille des Wnt sont présentes lors de la formation de la placode. Des études ont montré, grâce à une lignée de souris transgéniques exprimant un vecteur d'expression TOP-GAL inductible par le complexe LEF1/ β -caténine, que le gène rapporteur de la β -galactosidase s'exprimait spécifiquement dans les placodes et les condensations dermiques. Grâce à ces observations nous pouvons penser que la voie Wnt est active dans les deux composantes dermique et épidermique des follicules pileux en développement [49]. Dans l'embryon de souris, Wnt10b est initialement exprimé uniformément dans l'épiderme et surexprimé dans les placodes [53, 54], alors que chez le poulet c'est

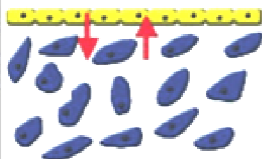
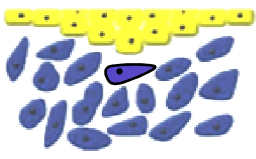
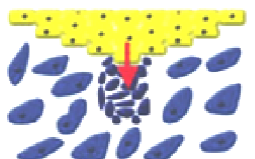
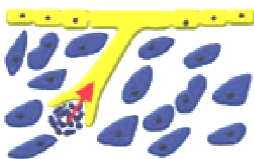
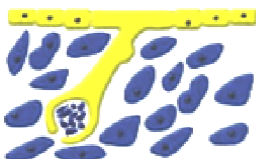
Induction		Organogénèse		Cytodifférenciation
E13: Stade 0 : Epiderme non différencié	E14: Stade 1 : Placode	E15.5: Stade 2 : Primordium	E16.5-17.5: Stade 3-5 : Bourgeon	E18.5: Stade 6-8 : Bourgeon bulbeux
 <p>Interaction de gradients d'activateurs et d'inhibiteurs créant un champ inducteur dans l'épiderme et le derme</p> <p>Premier message: "faire une annexe", rôle clé pour la signalisation de WNT et β-Caténine</p>	 <p>Prolifération de la placode</p> <p>Wnt10a (?), Wnt10b, βCaténine, Tcf</p> <p>EdaA1/EdaR/NF-κB Noggin/Lef-1 Follistatine (FS)? FGF/FGF2 ? TGFβ2/TGFβRII ? DELTA-1/NOTCH-1 ? β1-intégrin, P-cadhérine, NCAM ?</p> <p>Inhibition de la formation de la placode dans les cellules environnantes:</p> <p>BMP2, BMP4, p75NTR ACTIVINES DELTA-1/NOTCH-1 E-cadhérine</p>	 <p>Signal épithélial:</p> <p>WNT?</p> <p>Prolifération des cellules épidermiques du germe:</p> <p>SHH/Gh2 FGF2R-IIIb</p> <p>Formation de la condensation dermique</p> <p>PDGF-A SHH p75NTR</p>	 <p>Second signal dermique</p> <p>ACTIVINβA/F5? HGF? <i>Sox 18?</i></p> <p>Prolifération de l'épiderme folliculaire:</p> <p>SHH/Gh2</p> <p>Polarité du follicule, formation de la tige :</p> <p>Wnt/β-caténine Noggin/Lef-1 SHH ? FGF2R-IIIb</p> <p>Allongement du follicule:</p> <p>TGFα/EGFR <i>E1s2</i> FGF2R-IIIb</p>	 <p>Différenciation de l'IRS</p> <p><i>CUTLI</i></p> <p>Différenciation de la tige:</p> <p>NOTCH-1 BMP2, BMP4 BMPRIa WNT's <i>Lef-1</i> <i>HoxC13</i> <i>WHN</i> <i>Msx1, Msx2</i> <i>GATA-3</i></p> <p>Migration des mélanocytes et des cellules hématopoïétiques.</p> <p>Innervation et Vascularisation</p>

FIGURE 1.6 – **Bases moléculaires de la formation des follicules pileux chez l'embryon**
La formation des follicules pileux et des annexes cutanées en général, fait l'objet d'un dialogue entre les cellules du derme et de l'épiderme. Les principaux signaux qui médient ces interactions sont indiqués en rouge (modifié d'après [52]).

la molécule Wnt7a qui joue ce rôle [55]. Une fois WNT exprimée, nous retrouvons l'accumulation de la β -caténine au niveau des futures placodes alors qu'ailleurs dans le derme sa répartition est diffuse [51] (figure 1.8). Ce profil d'expression se vérifie aussi bien chez la souris que chez le poulet.

Par ailleurs il a été montré que la perte de fonction de la β -caténine au niveau de l'épiderme de souris ne permettait pas la formation de placodes [56]. De plus, chez les souris *Lef1*^{-/-} (KO du gène effecteur de la voie Wnt) le nombre de follicules pileux est très fortement réduit, par contre la structure de ces follicules paraît normale, suggérant que d'autres membres de la famille LEF/TCF remplacent l'absence de Lef1 [50, 57].

Comme nous pouvons le constater, plusieurs membres de la voie des *Wnt* ont un rôle à jouer dans l'initiation et la formation des primordia de follicules pileux.

1.2.1.2.2 Les facteurs de croissances fibroblastiques

La voie des Wnt n'est pas la seule à jouer un rôle fondamental lors de la formation des placodes. Une autre famille de molécules impliquée est celle des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs). Les FGF sont des protéines diffusibles. Pour l'instant 23 membres ont été répertoriés. La liaison au niveau de cellules cibles avec leurs récepteurs respectifs, les FGFR, entraîne la transcription de gènes cibles et l'activation de voies de signalisation. De plus les FGFs s'expriment spécifiquement lors de la formation des annexes cutanées et plus particulièrement dans les stades précoces du développement du follicule.

Chez le poulet, l'application de FGF 1, 2 ou 4 dans un épiderme indifférencié induit la formation de plumes [58, 59, 60]. Toujours chez le poulet, l'adjonction de billes imprégnées de FGF2 sur des cultures de peaux dorsales prélevées chez des mutants *scaleless*, caractérisés par l'absence de phanères, restaure un phénotype sauvage et aboutit à la formation de plumes [61, 62]. Inversement, chez la souris une mutation entraînant une perte de fonction dans le gène FGF 2-IIIb empêche le développement normal de la peau et du follicule pileux [63].

Les FGF pourraient jouer un rôle au niveau de l'expression de la β -caténine dans la placode. En effet, une étude a montré que l'on pouvait modifier le profil d'expression de la β -caténine après surexpression de FGF4 dans la peau d'embryon de poulet [64].

1.2.1.2.3 La superfamille des « Transforming Growth Factors » (TGF- β)

La superfamille des TGF- β se divise en trois familles de molécules impliquées dans la morphogénèse de la peau et du follicule pileux. Ces trois familles sont les « transforming growth factors » ou TGF- β , les « Bone Morphogenetic Protein » ou BMPs (à l'exception de BMP-1) et les Activines.

1.2.1.2.3.1 La signalisation « Bone Morphogenetic Protein » (BMP)

Les membres des protéines morphogénétiques de l'os (BMP) sont considérés comme des inhibiteurs de la formation du follicule. A l'heure actuelle, on dénombre plusieurs membres de cette famille pouvant

avoir un rôle dans la formation placodale. *Bmp2*, s'exprime de façon diffuse dans l'ectoderme, puis son expression augmente de façon ponctuelle au niveau des futures placodes et diminue dans l'épiderme interplacodal chez le poulet [65]. *Bmp7* s'exprime dans la placode alors que *Bmp4* se localise dans le mésoderme préfolliculaire. Pendant la formation de la placode ces molécules ont un rôle inhibiteur. Ainsi une surexpression de ces gènes au niveau de la peau chez l'embryon de poulet inhibe la formation des placodes [56, 59, 65]. A l'inverse plusieurs molécules capables d'inhiber les BMPs s'expriment dans la peau au stade placodal. Parmi celles-ci nous avons : *Noggin*, la *Follistatine* (FS) ou encore *Gremlin* [66, 67, 68, 69, 46, 70, 71]. L'expression ectopique de *Noggin*, entraîne la formation de follicules ectopiques chez la souris et le poulet [65]. A l'opposé, le KO de *Noggin* chez la souris provoque un développement anormal, couplé à une réduction du nombre total de follicules [66].

1.2.1.2.3.2 L'implication des TGF- β dans la formation des placodes

Le gène *TGF- β 2* est important pour la formation de la placode. Plusieurs études ont montré qu'il s'exprimait à la fois dans la placode et dans la condensation dermique [72, 73]. Il est capable d'induire la formation de condensations dermiques chez l'embryon de poulet [72, 73] ainsi que de follicules pileux dans des explants de peau de souris en culture [74].

En accord avec ces résultats, des souris knock-out pour ce gène montrent une forte réduction du nombre de follicules pileux et un retard prononcé dans leur morphogenèse [74].

1.2.1.2.4 La voie de signalisation de l'ectodysplasine (EDA)

Plus récemment, une nouvelle voie de signalisation a été identifiée dans le développement embryonnaire de la peau et des dents (pour revue [75]). L'ectodysplasine, EDA, et son récepteur EDAR [47] appartiennent à la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces deux gènes sont spécifiquement exprimés au niveau de l'épiderme lors de la formation placodale. Un knock-out de ces gènes affecte directement la morphogenèse des follicules pileux et des dents [76, 77, 78]. Les études de ces auteurs montrent qu'ils seraient impliqués très précocement en réponse au premier message dermique ubiquitaire.

Ainsi *Eda* et *Edar* précèdent et régulent l'expression de *Bmp4* et *Shh*, et EdaA1/EDAR inhibent l'activité du facteur de transcription NF- κ B [79, 53]. Chez des souris mutantes pour EdaA1, l'expression de *Wnt10b* est abolie. Le signal EdaA1 peut donc, directement ou non, stimuler l'expression de *Wnt10b* et activer la voie canonique des Wnt via la β -caténine [80, 81].

1.2.1.2.5 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est activée après association des ligands Delta et Serrate/Jagged à la partie extracellulaire du récepteur Notch (pour revue [82]). L'ensemble de ces gènes s'expriment dans la placode et le mésenchyme sous-jacent et contribuent à la détermination du follicule pileux [83, 84, 85]. Chez le poulet le ligand Delta-1 s'exprime dans le mésenchyme sous-jacent à la placode [86, 87, 84, 62].

Lorsque celui-ci est exprimé anormalement dans une petite partie de l'épithélium, il y a une augmentation de l'expression de Notch1 et une accélération de la formation des placodes. Aux alentours les placodes sont brutalement supprimées. Une expression uniforme de ce ligand dans le derme se retrouve chez les poulets mutants *scaleless* [62]. De plus cette étude a montré que la molécule Fgf2 contrôlait l'expression de Delta-1. Ainsi les facteurs de croissance FGF activeraient la voie de signalisation Notch/Delta et permettre la formation des placodes, en accord avec suivant le schéma suivi par les grandes voies Wnt, FGF et BMP.

En résumé, un grand nombre de gènes seraient impliqués suite au premier signal dermique. L'orchestration et les interactions de ces différentes molécules n'ont pas encore été établies clairement, bien que ces gènes exercent des rôles fondamentaux lors des étapes qui vont initier la formation des placodes (figures 1.6 & 1.7). Une dernière famille de gène pourrait participer à la formation placodale. Il s'agit de la famille de gènes à homéobox *Msx1* et *Msx2*, qui sont exprimés dans les placodes [88]. Des études ont montré que des souris KO pour ces 2 gènes avaient un nombre réduit de follicules pileux [89]. Finalement, les placodes épidermiques vont se former et, durant l'étape suivante, envoyer un signal en réponse au derme, permettant aux cellules sous-jacentes de se condenser.

1.2.1.3 Les condensations dermiques

Suite à la formation des placodes, les cellules de l'épiderme vont envoyer un signal aux cellules dermiques sous-jacentes et initier la formation de condensations dermiques (figures 1.6 & 1.7). A l'heure actuelle ce groupe de signaux est très mal connu. Deux candidats potentiels ressortent pourtant. La voie des Wnt, puisque suite à des expériences de transgénèses chez la souris, il a été montré que l'expression de gènes cibles (ici d'un gène rapporteur TOPGAL dont l'activation dépendait des Wnt) se faisait spécifiquement dans les condensations dermiques [49]. Une autre étude montre, qu'en l'absence de β -caténine, les condensations dermiques ne se forment pas [56]. Récemment, une étude a montré que chez le poulet, la molécule FGF2 était, à elle seule, capable d'induire la formation de condensations dermiques [90].

1.2.1.4 Le second signal dermique

Suite à la formation des condensations dermiques, un deuxième groupe de signaux dermiques permet aux cellules de la placode de proliférer et de s'invaginer au niveau du derme. « Le second signal dermique » régule la prolifération et l'invagination de l'épithélium folliculaire (figures 1.6 & 1.7). Cette prolifération est contrôlée par la molécule Shh (Sonic Hedgehog) qui est exprimée dans les cellules épidermiques sus-jacentes aux condensations dermiques [91, 92, 54].

Sonic Hedgehog (ou Hh) a d'abord été caractérisé chez la Drosophile. Chez les vertébrés, la protéine Shh active des voies de transduction du signal par l'intermédiaire des protéines Gli-1 et Gli-3 [93, 94]. Ces deux protéines Gli respectivement activent ou répriment la transcription de gènes cibles. Des études

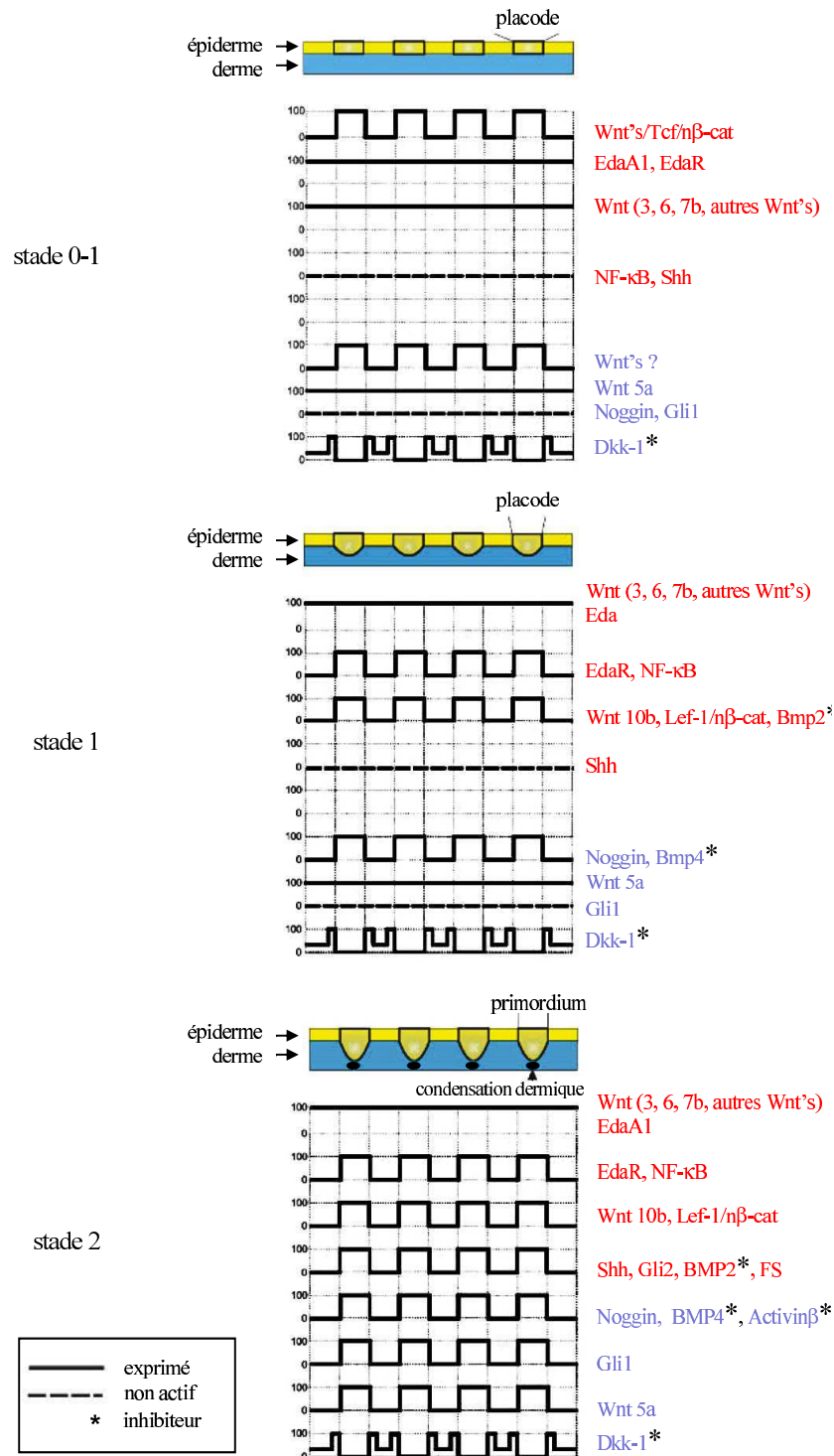


FIGURE 1.7 – Schéma illustrant les différents gradients de molécules impliqués dans la formation de la placode

Les stades 0 et 1 concernent l'induction, le stade 2, l'organogenèse précoce. Les gradients vont de 0 (quand il n'y a pas de protéine) à 100 (quand la protéine est exprimée fortement dans l'aire de la placode). Le rouge correspond aux signaux ectodermiques, en bleu les signaux mésodermiques. Les astérisques marquent les inhibiteurs connus de la formation du follicule pileux. L'activité de ces inhibiteurs est de bloqué spécifiquement leurs antagonistes : Noggin pour BMP2/4, la Follistatine (FS) pour l'Activine β A et Wnt pour Dkk1. Au stade 0-1, les membres de la famille des facteurs de transcriptions $\text{NF-}\kappa\text{B}$ seraient exprimés mais cela reste encore assez flou (modifié d'après [52]).

ont montré que le gène *Shh* agissait après la voie de signalisation des Wnt. Ainsi des souris KO pour gène de la β -caténine perdent l'expression de gène *Shh* au niveau des follicules pileux [56]. *Shh* ne contribue donc pas aux événements précoces de formation des placodes. Il a été montré que le récepteur de *Shh*, Patched (PTC) était présent non seulement dans l'épithélium folliculaire mais aussi au niveau des condensations dermiques [95, 96, 97].

D'autres facteurs que *Shh* participeraient aussi au deuxième signal dermique : l'Activine β A est une molécule de signalisation sécrétée et exprimée dans la condensation dermique [68, 71]. Des souris KO pour l'Activine β A présentent un défaut dans la formation des follicules de vibrisses [98]. Le facteur de croissance des hépatocytes est exprimé dans les condensations dermiques. Son récepteur (Met) est exprimé dans l'épithélium folliculaire [99]. Lorsque l'on surexprime ce facteur dans des souris, on obtient une augmentation du nombre de follicule pileux avec une accélération de leur développement, suggérant un rôle possible dans la signalisation entre le mésenchyme folliculaire et l'épithélium. Enfin le facteur de transcription SOX18 est aussi un candidat potentiel. Son expression se situe dans les condensations dermiques. Des souris homozygotes et ayant une version mutante, semi-dominante du gène ont plusieurs problèmes au niveau de la formation du poil. La famille SOX aurait alors un rôle possible dans le développement ou la fonction des condensations dermiques [100].

En résumé, l'invagination des cellules de la placode dans le derme forme le bourgeon pileux. Nous allons maintenant aborder le contrôle moléculaire permettant l'apparition et la différenciation des gaines cellulaires formant le poil. A la naissance, une fois le bourgeon du follicule formé, des cellules indifférenciées (les cellules de la matrice) vont proliférer. En migrant progressivement le long de l'axe du follicule (en remontant jusqu'à l'épiderme), ces cellules vont progressivement se différencier en sept couches épithéliales concentriques constituant ainsi le follicule pileux mature. Nous allons maintenant voir quels sont les mécanismes moléculaires qui gouvernent ces processus.

1.2.1.5 Différenciation de la tige du poil

Plusieurs gènes sont responsables de la détermination et du maintien phénotypique permettant aux différentes couches du follicule d'être aussi bien organisées (figure 1.6).

1.2.1.5.1 La voie de signalisation Notch

Notch1 est une protéine membranaire impliquée dans le déterminisme cellulaire. Cette protéine a deux ligands : Serrate1 et Serrate2. Plusieurs études ont montré que Notch1 et ses deux ligands étaient exprimés dans les cellules de la matrice du poil. Ces cellules donneront plus tard la tige du poil et les couches de l'IRS [85, 101, 84]. Lorsque l'on exprime le gène *Notch1* sous le contrôle du promoteur de la kératine A1, dans les cellules précurseur de la tige, la différenciation des cellules de la médulla et de la cuticule est perturbée [102]. Notch1 apparaît donc être un des facteurs qui contrôle les kératinocytes

lorsqu'ils quittent la matrice et se différencient en plusieurs types cellulaires spécifiques au sein du follicule pileux [103, 104].

1.2.1.5.2 La voie des Wnt

Plusieurs études permettent de montrer un rôle important de la signalisation Wnt lors de la différenciation au niveau de la tige du poil. Une expression de Wnt, sous la réponse d'un gène rapporteur TOPGAL, montre une apparition d'un signal dans les cellules précurseurs de la tige lorsqu'elles lancent le processus final de différenciation [49]. Ces cellules expriment alors la protéine Lef1 et Dishevelled 2, des molécules de la voie de signalisation des Wnt [49, 105] (figure 1.8). Les cellules adjacentes, quand à elles, expriment le gène *Wnt3*. Une expression ectopique de *Wnt3* dans la gaine externe du poil finit par fragiliser la tige [105] et le manque d'expression de Lef1 entraîne une très faible kératinisation dans les quelques tiges du poil qui apparaissent [50]. Enfin il a été démontré que ce facteur de transcription se fixait sur des sites spécifiques au niveau des régions régulatrices de gènes codant pour les kératines du poil [106].

1.2.1.5.3 La signalisation des BMPs

Dans les follicules matures, *Bmp4* s'exprime au niveau de la papille dermique. De plus *Bmp2* et *Bmp4* sont tous les 2 présents dans les cellules précurseurs de la tige du poil [107, 108]. Une expression ectopique de *Bmp4* dans la gaine interne du follicule pileux inhibe la prolifération des cellules de la matrice et active en parallèle les gènes des kératines spécifiques des poils dans la gaine externe [109]. Lorsque l'on exprime *Noggin*, grâce à la fusion avec le promoteur du gène *Msx2*, dans les cellules de la matrice, des déficiences apparaissent au niveau de la différenciation de la tige du poil, du cortex et de la cuticule. De plus nous assistons à une perte des marqueurs de différenciation de la tige du poil (comme la trichohyaline et certaines kératines du poil) et à une inhibition de l'expression de plusieurs facteurs de transcription normalement exprimés dans les follicules matures (*Foxn1*, *Hoxc13* et *Msx1*) [107].

1.2.1.5.4 Les gènes à homéoboîte

1.2.1.5.4.1 Les gènes *Hox*

Les gènes à homéoboîtes *Hox*, contribuent à la différenciation des follicules pileux. Les gènes *Hox* s'expriment dans des domaines bien limités et superposés le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon en respectant une règle dite de colinéarité, selon laquelle le domaine d'expression dans l'embryon est d'autant plus caudal que le gène se trouve vers l'extrémité 3' du complexe. Ainsi ces groupes de gènes seraient des représentations moléculaires de l'embryon sur les chromosomes. Les produits des homéogènes dirigent la spécification régionale des territoires du corps [110]. Si les gènes *Hox* sont responsables de l'établissement de l'identité régionale le long de l'axe antéro-postérieur au cours du développement

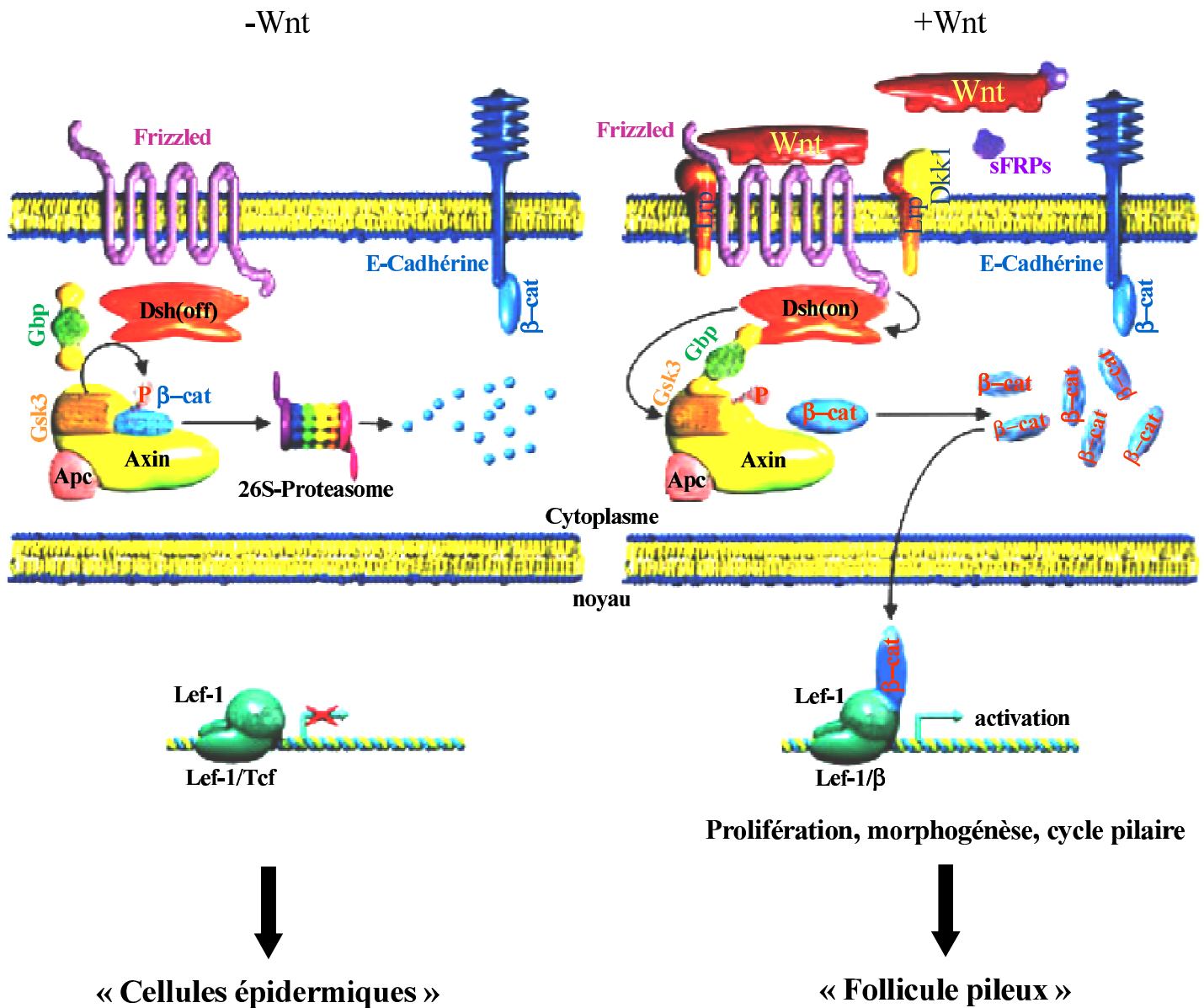


FIGURE 1.8 – La voie de signalisation des Wnt

En l'absence de la stimulation de Wnt (Figure de gauche), la β -caténine non complexée est phosphorylée par le complexe Gsk3b (Glycogène Synthase Kinase 3b) et dégradée par la voie des ubiquitines-proteasomes. Wnt est ajouté (Figure de droite). Il se lie spécifiquement à une famille de récepteurs transmembranaires, les protéines Frizzled (FZ) et à son co-récepteur, des membres de la famille de protéines LPR : LPR5/6. La présence de Wnt permet la stabilisation cytoplasmique de la β -caténine grâce à l'inactivation du complexe Gsk3b par la protéine Dishevelled (Dsh) maintenant active. La stabilisation de la β -caténine non-phosphorylée conduit à sa translocation dans le noyau où elle se complexe avec les facteurs de transcriptions Tcf/Lef. Les gènes cibles de ce nouveau complexe seront alors transcrits et exprimés (modifié d'après [52]).

embryonnaire après la gastrulation, ils participent également à des processus développementaux plus tardifs comme la morphogenèse de la peau. Ainsi, il a été démontré que 33 des 39 gènes *Hox* connus sont actifs respectivement dans l'épiderme, le derme, la gaine interne de la racine du poil et dans d'autres sous-populations du follicule pileux [111], comme *Hoxc13* régulant l'expression de certains gènes codant pour des protéines associées à des kératines [112]. Un grand nombre de gènes *Hox* sont actifs dans les premières condensations épidermiques et mésenchymateuses qui apparaissent au stade embryonnaire E14,5 chez la souris. Ils marquent le début de la formation des ébauches des follicules pileux. Certains de ces gènes respectent la règle de colinéarité au niveau de la peau, alors que d'autres sont exprimés dans l'ensemble des annexes cutanées et sur tout le territoire de l'embryon (pour revue [113, 114]). L'expression du gène *Hoxa5* est confinée à la gaine interne du follicule pileux, alors que *Hoxa4* est spécifiquement détecté au niveau des glandes sébacées [115]. Les gènes *Hoxd9*, *Hoxd11* et *Hoxd13*, quant à eux, sont tous restreints à l'épiderme et à la partie épithéliale des follicules pileux, alors que *Hoxc8* est exprimé à la fois dans l'épiderme, le derme et les papilles dermiques des primordia des poils [116]. Le knock-out du gène *Hoxc13* chez la souris présente un phénotype alopécique après la naissance [117]. Les mutants homozygotes présentent des anomalies graves dans les sites majeurs de synthèse de kératine des poils. Les vibrisses et les poils se développent, mais ne peuvent pas s'ancrer au niveau de la peau. De plus, on observe des anomalies des ongles, de l'épithélium de la langue et de la queue [111].

Les gènes *Hox*, jouent donc un rôle central dans la morphogenèse de la peau et de ses annexes. Ils contribuent à la prolifération des kératinocytes, contrôlent les décisions cellulaires au cours de la différenciation des annexes du tégument et permettent l'établissement de la polarité au niveau du follicule pileux [114].

1.2.1.5.4.2 Les gènes *Msx1* et *Msx2*

Les gènes à homéoboîte *Msx1* et *Msx2* participent pleinement aux processus de développement et de différenciation du follicule pileux. Chez la souris ces deux gènes s'expriment aussi dans les cellules épithéliales de la matrice [118]. L'inactivation de *Msx2* entraîne de graves anomalies au niveau de la différenciation de la tige du poil [89]. De plus, le KO des deux gènes provoquent une forte réduction du nombre de follicule pileux, phénotype que l'on retrouvait déjà pour les souris TGF- β 2^{-/-}. Le fait que les follicules ne disparaissent pas entièrement prouve que d'autres voies sont requises et existent en parallèle de celles-ci.

1.2.1.5.4.3 Le gène *Dlx3*

Une étude a démontré que le gène *Msx1* pouvait interagir avec *Dlx3*. *Dlx3* est aussi un gène à homéoboîte qui serait impliqué dans le développement ou la différenciation des follicules pileux. Il s'exprime spécifiquement au niveau des cellules de la matrice du bourgeon du poil vers la fin de la période em-

bryonnaire [119]. La fonction de ce gène est pourtant difficile à établir. En effet son knock-out engendre la mort de l'embryon à 10,5 jours *post-coïtum*, ce qui ne permet pas pour l'instant d'aborder son rôle au niveau des follicules pileux. Cependant, chez l'Homme, plusieurs mutations au niveau de ce gène sont responsables de la pathologie appelée « syndrome TDO » (Tricho Dento Osseous) et qui se traduit au niveau de la peau par une pousse de cheveux ondulés et recourbés [120, 121].

1.2.1.5.5 Le rôle de l'acide rétinoïque.

L'acide rétinoïque joue un rôle important lors du contrôle de la prolifération et de la différenciation épidermique. L'acide rétinoïque dirige aussi la formation des ébauches des organes par l'intermédiaire des gènes *Hox*. Ces récepteurs, RAR et RXR, sont actifs dans la gaine externe du follicule pileux ainsi qu'au niveau des cellules souches épidermiques [122, 123, 124] (pour revue [125, 113]).

En résumé, de nombreux gènes participent à la formation de la première tige du poil pendant le développement embryonnaire (pour revues [2, 45, 52]) (figure 1.9). Après la formation initiale du follicule pileux, ce dernier entre dans des étapes cycliques pour assurer son renouvellement constant. Il semble que la plupart des gènes impliqués dans la formation des follicules pileux participent également au cycle pileux. Nous allons voir, dans la partie suivante les mécanismes moléculaires à l'origine du maintien de ce cycle.

1.2.2 Le cycle du poil : contrôle moléculaire et cellulaire par les grandes voies de signalisation

A partir de la naissance, les follicules pileux entrent dans des phases cycliques de renouvellement. On distingue les périodes de croissance active (phase anagène), de régression (catagène) et de repos (télogène) [44]. Toutes ces phases successives seraient contrôlées par des interactions entre l'épiderme d'une part et le derme d'autre part [126]. Lors de la phase anagène, de très nombreux facteurs participent à la formation de la tige du poil et des couches cellulaires concentriques du follicule. Au cours du stade catagène, il semblerait que ce soit l'arrêt de toutes les voies de signalisation actives pendant l'anagène qui aboutissent à la régression de l'épithélium du follicule pileux. Seule la papille dermique est maintenue, mais dans un état quiescent. Pendant le télogène, les signaux inhibiteurs prédominants maintiennent le follicule pileux dans un état quiescent [127]. Même si les données actuelles sont assez limitées en ce qui concerne le cycle pileux, il est clair que les voies de signalisation actives durant la morphogenèse du follicule pileux sont en partie réutilisées lors de la vie post-natale et ceci pendant toute la durée du cycle du poil (figure 1.9).

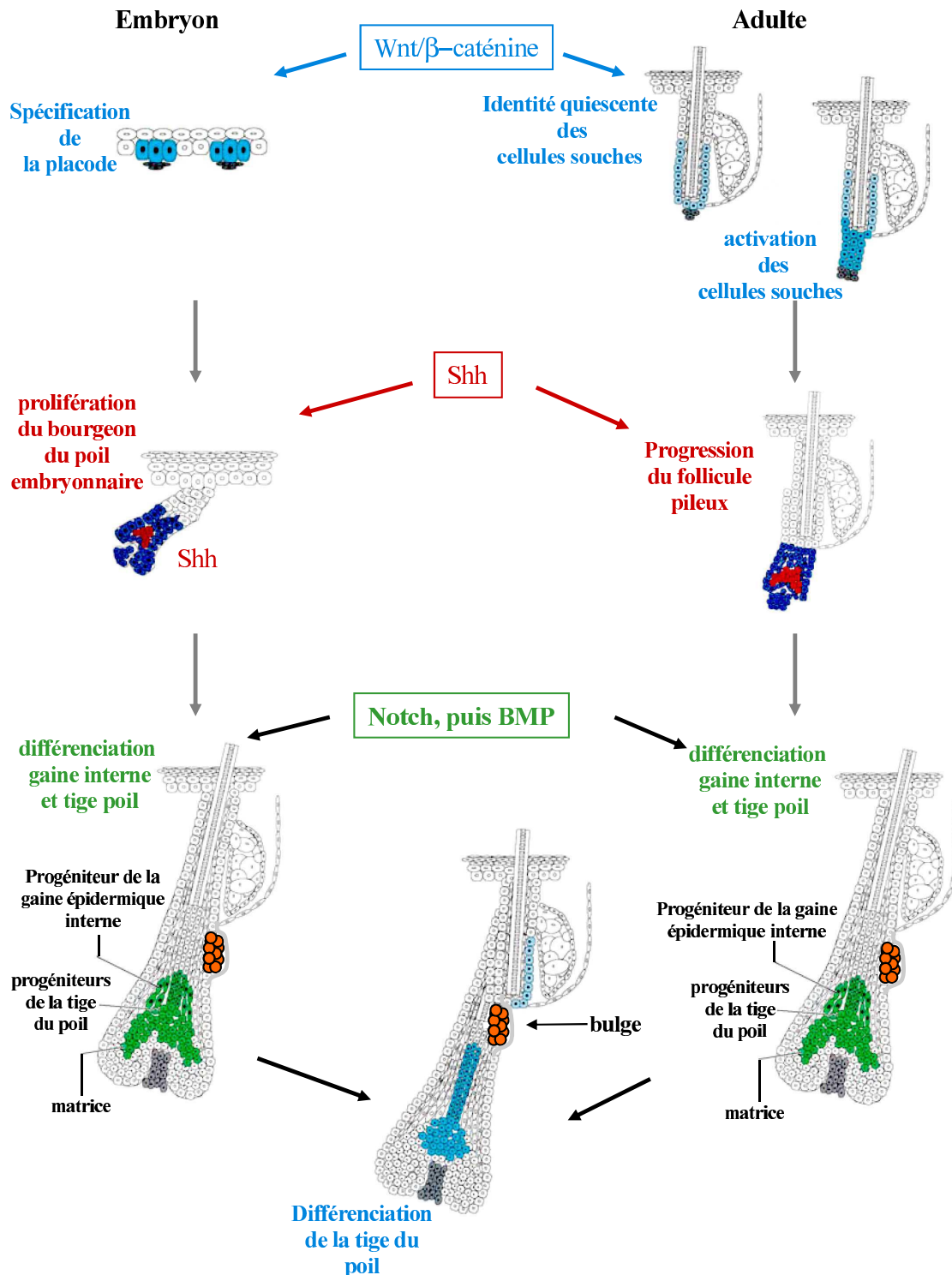


FIGURE 1.9 – Des voies de signalisation majeures identiques sont impliquées dans la morphogénèse embryonnaire et la régénération lors du cycle du follicule pileux chez l'adulte

La voie de signalisation Wnt/β-caténine agit très précocément dans la spécification du primordia pileux et dans l'activation des cellules souches quiescentes du bulge. La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) correspond à la deuxième étape et active la prolifération du bourgeon du poil chez l'embryon et lors du cycle pileux. Les BMPs, Notch et la voie de signalisation Wnt/β-caténine interagissent lors de la différenciation concentrique des cellules de la matrice en tige du poil et de ses différentes gaines épidermiques (modifié d'après [2]).

1.2.2.1 La phase anagène

1.2.2.1.1 Les facteurs de croissance FGF

Les facteurs de croissance de la famille FGF participent à la régulation du cycle. Deux actions possibles ressortent clairement pour ces molécules. Certaines pourraient contribuer à la croissance du poil alors que d'autres seraient impliquées dans la régulation de la transition entre la phase anagène et la phase catagène. Chez la souris le facteur *Fgf7* s'exprime au niveau de la papille dermique. Son expression diminue lors de la phase anagène [128]. Les récepteurs des FGF ont aussi un rôle à jouer. Un grand nombre sont spécifiques de structures cutanées durant le stade anagène. Le gène du récepteur *Fgfr1* s'exprime au niveau de la papille dermique. Le récepteur *Fgfr2* est présent dans les cellules de la matrice du poil. Le gène du récepteur *Fgfr3*, quant à lui, se localise dans le bulbe, dans la zone précorticale. Enfin, à l'opposé de *Fgfr3*, le gène *Fgfr4* s'exprime dans les cellules des gaines interne et externe du poil et les cellules de la périphérie du bulbe [128].

1.2.2.1.2 Le facteur « Epithelial Growth Factor » (EGF)

Pendant la phase anagène, ce facteur de croissance est exprimé au niveau de la gaine externe, au niveau de la couche basale de l'épiderme et dans les glandes sébacées. Le facteur EGF possède quatre récepteurs différents appelés EGFR ou ErbB1 à ErbB4.

EGF s'exprime pendant toute la phase catagène pour disparaître à l'entrée en télogène [129]. Chez la souris, des études ont montré qu'une surexpression du récepteur ErbB2 dans la gaine externe entraînait une alopecie prononcée [130]. Si l'on fait un KO de ce gène les embryons de souris meurent à la naissance. Seule une petite partie survit jusqu'à 3 semaines et montre de graves problèmes dans le développement cutané (peau et follicules confondus) [131, 132]. ErbB2 est donc une molécule centrale dans l'initiation de la croissance du poil.

1.2.2.1.3 L'acide rétinoïque et la vitamine D

L'acide rétinoïque et la vitamine D sont deux molécules essentielles pour la prolifération cellulaire. Elles font parties de deux grandes voies de signalisation faisant intervenir leurs récepteurs respectifs. Ces deux grandes voies seraient primordiales dans le cycle du poil. Nous allons plus particulièrement nous intéresser aux récepteurs nucléaires des rétinoïdes, $RAR\alpha$ et RXR, qui se subdivisent en deux versions : $RXR\alpha$ et $RXR\beta$, ainsi qu'au récepteur de la vitamine D, le VDR. Ces trois récepteurs d'hormones sont impliqués dans le contrôle de la phase anagène. Plusieurs études montrent qu'ils peuvent former des hétérodimères (par exemple l'hétérodimère VDR/RXR) et permettre l'activation de la transcription de certains gènes liés au cycle du poil. Le récepteur $RXR\alpha$ participe à l'initiation de l'anagène et joue un rôle central dans la maturation de la peau [133]. Un retard de croissance apparaît au niveau du follicule pileux lorsque l'on supprime spécifiquement l'expression de $RXR\alpha$ au niveau de la couche basale de

l'épiderme et au niveau de la gaine externe du follicule. Des souris KO pour le gène codant pour $RXR\alpha$ vont présenter une alopecie progressive (destruction de l'intégrité du follicule, formation de cystes épidermiques et d'utricules) [133, 134]. A contrario, l'inactivation des récepteurs $RAR\alpha$ et $RXR\beta$ ne semble rien changer au destin des structures cutanées dans leur ensemble. En ce qui concerne le récepteur de la vitamine D, son knock-out présente des caractéristiques identiques à celle du KO de $RXR\alpha$ [135]. VDR s'exprime au niveau de l'ORS et de la papille dermique au début de la phase anagène. Son expression augmente progressivement lors du passage de l'anagène au catagène [136]. Nous pouvons donc en conclure, d'après l'ensemble de ces données, que les hétérodimères formés par les récepteurs nucléaires VDR/RXR pourraient jouer un rôle central dans le maintien du cycle pileux, et notamment au niveau de l'initiation du stade anagène.

1.2.2.1.4 Les « Insulin-like Growth Factor » (IGF)

Un autre facteur de croissance contribue au cycle. Il s'agit du facteur IGF (Insulin-like Growth Factor) dont le mode d'action au niveau cellulaire passe par sa liaison avec des récepteurs spécifiques : Igf-1r [137]. Il présente de fortes homologues structurales avec l'insuline et a des effets analogues dans le métabolisme du glucose. Dans les follicules pileux, IGF permet de stimuler la division cellulaire, après activation [138]. IGF et le récepteur Igf-1r sont exprimés au niveau de la peau et du follicule. L'expression du récepteur IGF-1R est optimale lors de la transition vers la phase catagène [139].

1.2.2.1.5 La voie de signalisation des Wnt

La voie de signalisation des Wnt a un effet prépondérant sur le cycle. Lorsque la phase anagène commence, le transcrit du gène *Wnt10b* se localise dans les cellules épithéliales adjacentes à la papille [53]. Toujours grâce à des expériences utilisant un gène rapporteur (TOPGAL) sensible à l'action des Wnt, la présence de la β -galactosidase a été retrouvée dans le bulge du follicule [49]. Chez la souris, lors du KO conditionnel du gène de la β -caténine, effecteur principal de la voie Wnt, la phase anagène n'arrive pas à se mettre en place [56]. Enfin lorsque l'on cultive des cellules de papilles dermiques isolées en présence de certaines protéines Wnt, il y a un maintien des propriétés spécifiques du follicule pileux, perdues lors des différents passages cellulaires [140]. Ainsi les Wnt prennent une part importante dans les signaux inductibles entre l'épithélium folliculaire et le mésenchyme des follicules après la naissance.

1.2.2.1.6 Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog (Shh) prend part aussi au renouvellement du follicule. Shh n'est pas nécessaire pour l'initiation de la phase anagène, par contre cette protéine est essentielle pour les événements annexes, comme la prolifération des cellules épithéliales du follicule dans le derme [141]). Une expression ectopique de Shh est capable d'induire une nouvelle phase de croissance dans un follicule au repos [142].

En résumé, pendant l'anagène, les signaux échangés entre les cellules épithéliales du bulbe et les fibroblastes de la papille folliculaire s'intensifient pour atteindre un maximum à la fin de ce stade. Une grande variété de récepteurs et de signaux intracellulaires appartenant aux grandes voies de signalisation (EGFR, β -caténine, FGFR, IGFR) sont exprimés dans les kératinocytes de la matrice du follicule pileux tandis que leurs ligands (EGF, Wnt, FGF, IGF) sont détectés au niveau de la papille dermique. Plusieurs autres molécules peuvent aussi participer au contrôle du cycle pileux. Par exemple citons FGF5 ou encore la protéine Hairless, au centre de ce projet de thèse. Ces deux protéines ne sont pas requises dans cette phase, mais elles peuvent tout de même avoir un rôle à jouer [143, 144]. La papille est donc la source des activateurs de la prolifération cellulaire qui assurent la croissance de toutes les composantes du follicule pileux. Par contre, les mécanismes moléculaires du renouvellement des tiges de poils ne sont pas élucidés. Ces facteurs de croissance pourraient former un gradient depuis les fibroblastes de la papille en direction des cellules du bulbe sus-jacentes. Ainsi, les cellules de la matrice recevraient une quantité bien particulière de facteurs diffusibles par rapport aux cellules disposées plus latéralement. Cette combinaison de plusieurs gradients de signaux dirigerait alors la différenciation des gaines concentriques du follicule pileux, la formation des composantes de la tige et la croissance du poil.

1.2.2.2 La phase catagène

Comme nous l'avons déjà vu, le stade catagène se définit par la régression du follicule pileux suite à une apoptose des cellules de la matrice. A nouveau, un grand nombre de molécules et de gènes sont impliqués dans ces processus.

1.2.2.2.1 Les neurotrophines

Les neurotrophines BDNF et NT3 prennent part à la phase catagène. Dans des souris transgéniques, une expression ectopique de ces molécules entraîne une phase catagène prématurée, qui se traduit par une inhibition de l'activité de la papille dermique, accompagnée d'un raccourcissement de la longueur des poils [145, 146]. Ces phénomènes résultent d'une réduction de l'expression de facteurs activateurs sécrétés par la papille et d'une entrée en apoptose beaucoup plus précoce des cellules de la matrice.

1.2.2.2.2 Les « Transforming Growth Factors » (TGF- β)

Les facteurs TGF β 1 et TGF β 3, ainsi que leurs récepteurs associés (de type I et II) participent à la dégénérescence du follicule. Ces 2 molécules sont présentes dans les follicules pileux pendant la transition entre la phase anagène et catagène [147, 148]. Dans des souris présentant un KO pour TGF β 1, il y a apparition d'un retard notable dans le déroulement du cycle : alors que le follicule devrait être en phase télogène il ne dépasse pas le début du catagène. A cause de la perte de ces facteurs, un nombre accru de cellules sont en prolifération alors qu'elles devraient être en apoptose. A l'inverse, après injection du TGF β 1, il y a une large augmentation du nombre de cellules en apoptose [149]. Dernièrement le

facteur TGF β 2 a aussi été mis en évidence pendant la phase catagène. Les caspases 3 et 9 peuvent être activées dans l'ORS et dans la partie inférieure du bulbe par ce facteur. De plus l'inhibition partielle de cette molécule retarde la phase catagène dans des cultures de follicules pileux [150]. A contrario, les phénotypes cutanés des souris générées par un KO conditionnel des deux types de récepteurs de TGF β 1 et TGF β 3 sont très peu sévères. La fonction de ces molécules en catagène n'a donc pas encore été bien élucidée.

1.2.2.2.3 Les facteurs de croissance FGF

Le facteur Fgf5 s'exprime au niveau de la gaine externe du follicule. Son expression semble conséquente au moment de la transition entre la phase anagène et catagène. Une délétion de ce gène entraîne un allongement du temps de la phase anagène. Les poils formés seront alors beaucoup plus long [151, 152, 153]. Le facteur Fgf5 apparaît donc comme un inhibiteur de l'élongation de la tige.

1.2.2.2.4 Le gène à homéoboites *Msx2*

Le gène *Msx2* participe à la différenciation du follicule pileux lors de chaque transition d'une phase du cycle à une autre. Pendant la première phase anagène, *Msx2* s'exprime au niveau des cellules de la matrice et dans la zone précorticale. Par la suite, cette expression se déplace et s'accroît vers les couches de la médulla et du cortex, au niveau de la partie supérieure du follicule pileux. Dans des souris *Msx2*^{-/-}, la phase anagène est raccourcie provoquant une entrée précoce en catagène. De plus la phase catagène est elle-même considérablement allongée. L'ensemble de ces problèmes finit par provoquer une alopecie cyclique [154]. A l'inverse, la surexpression de *Msx2* provoque un retard dans la croissance du follicule et une diminution de la taille de la matrice du poil [155]. Ce phénotype très particulier pourrait correspondre à un problème lors de la différenciation de la tige, faisant suite à une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des kératines au niveau du poil (comme par exemple le gène *Foxn1*) [156]. Le gène *Msx2* joue donc un rôle primordial dans la différenciation de la tige et interviendrait également au cours du cycle dans la régulation des transitions entre chaque phase.

1.2.2.2.5 Le gène *hairless*

Comme il sera discuté en détail plus loin, le profil d'expression du gène *Hr* est dynamique dans les diverses parties du follicule pileux et au cours du cycle, mais le rôle de la protéine HR est crucial pendant la phase catagène. Lorsque cette phase commence la protéine HR est fortement présente dans la gaine externe du follicule pileux (ORS) et en particulier dans la zone du bulge, niche de cellules souche putatives [157]. Cette présence est maintenue en télogène et l'anagène précoce, ce qui suggère un rôle-clé dans la régression du follicule pileux et la réinitiation de la croissance en phase anagène.

1.2.2.3 La phase télogène

Très peu de données existent sur les mécanismes moléculaires impliqués lors de la phase de repos. Des facteurs jouant le rôle d'inhibiteurs de la croissance seraient exprimés fortement pendant cette phase. Ainsi l'état quiescent des cellules serait maintenu le temps que les cellules du bulge migrent et relancent la production de facteurs activateurs de la croissance du poil [158]. Parmi ces facteurs inhibiteurs nous pouvons penser qu'il y aurait Bmp4, Shh, Bmpr1a, Lef1, la β -caténine et Fgf5 dans les cellules épithéliales germinatives et Bmp4 ainsi que le récepteur α des oestrogènes dans la papille folliculaire. Bmp4 aurait une contribution plus claire que celles des autres facteurs cités. En effet une étude montre que l'ajout de Bmp4 sur une zone sans poils (après épilation) provoquerait l'arrêt sélectif du développement de nouveaux follicules [159]. A l'inverse, l'adjonction de l'inhibiteur de Bmp4, Noggin, sur des morceaux de peaux produit une accélération de la transition télogène-anagène [159]. En parallèle, le récepteur α des oestrogènes est impliqué dans la régulation de *Bmp4* [160]. Ainsi lorsque l'on administre un antagoniste du récepteur α des oestrogènes il y a une induction du follicule de la phase télogène vers une nouvelle phase anagène [161].

En résumé, à cause du nombre très important et la répétition de tous ces facteurs au cours du cycle pileux, les études nécessaires pour comprendre le rôle physiologique et la chronologie des événements sont très difficiles à réaliser. Néanmoins quelques gènes principaux et un schéma général semble se dessiner. Pendant le stade anagène les voies des Wnt, Shh, la vitamine D et les rétinoïdes seraient prépondérants. Lors du passage en phase catagène ce serait le rôle des gènes *Msx2*, *Fgf5*, ou encore les TGF- β et *hairless* qui aurait une action essentielle. Enfin les BMPs réguleraient la phase de repos.

Dans la dernière partie de cette introduction je vais présenter le gène *hairless* qui se trouve au centre de ce travail de thèse : *hairless*. Ce gène participe pleinement au contrôle du cycle pileux grâce notamment à son rôle de régulateurs entre les grandes voies de signalisation dont les fonctions viennent d'être passées en revue.

1.3 Le gène *hairless* des mammifères

1.3.1 Description du gène *hairless* : expression et fonction

Le gène *hairless* (*Hr*) apparaît très tard au cours de l'évolution. Il n'a été identifié que chez les mammifères et son recrutement est étroitement associé à la présence du poil et du pelage chez cette classe de vertébrés. Pourtant, au sein des mammifères, *Hr* a été remarquablement conservé chez différentes espèces (homme, souris, rat, singe, mouton), suggérant qu'il pourrait être impliqué dans des voies fondamentales de régulation au cours du développement [162, 163, 164]. De manière fort intéressante, on retrouve des homologies de séquences avec des gènes responsables de la formation des trichomes chez

la plante crucifère *Arabidopsis thaliana*. Ce gène est étudié chez la souris depuis plus d'un siècle. Ainsi les premières lignées de souris *hairless*, contenant donc une mutation dans le gène, ont été élevées et maintenues en laboratoire à partir des années 20 [153]. Une mutation dans ce gène entraîne un phénotype particulièrement impressionnant chez l'homme ou la souris. Il se caractérise par une perte totale et définitive de tout poils et cheveux et ceci 17 jours post-partum chez la souris et 1 à 2 mois après la naissance chez l'homme [143].

La protéine *Hairless* (HR) a une fonction bien particulière. Il s'agit d'un corépresseur de la transcription de gènes. Cette protéine agit sur des gènes cibles dans le noyau à partir de complexes avec des partenaires protéiques. Une fois associé à l'ADN, le complexe inhibe la transcription des gènes [165].

Les résultats des analyses par hybridation *in situ*, RT-PCR et northern blot, montrent que le gène *hairless* s'exprime intensément dans la peau, les follicule pileux, le cerveau ainsi que dans d'autres tissus et organes au cours du développement embryonnaire et de la période post-natale [166, 167, 168].

Dans le cas du follicule pileux, plusieurs études ont montré qu'il s'exprimait au cours des trois phases du cycle pileux avec une préférence pour la phase catagène et télogène [157, 169].

Je présenterai de façon concise, dans un premier temps, les connaissances actuelles sur le gène et la protéine HR. Je décrirai ensuite les différents variants identifiés de la mutation *hairless* et leurs caractéristiques phénotypiques. Enfin j'aborderai l'ensemble des données récentes accumulées sur le rôle précis du gène *Hr* dans la biologie du follicule pileux, son site exact d'activité et ses partenaires identifiés.

1.3.1.1 Le gène et la protéine *Hairless* : structure et fonctions

1.3.1.1.1 Le gène *hairless*

Le gène *hairless* est localisé sur le chromosome 14q (brin D2) chez la souris (Accession number : NC_000080.5) [144, 170, 171]. Chez l'homme et le rat *Hr* est situé respectivement sur le chromosome 8p21.2 (Accession number : NC_000008.9) et le chromosome 5p11 (Accession number : NC_005114.2) [143, 167]. Ce gène, composé de 19 exons sur un total de 20 kb, code un ARNm d'environ 4 kb, transcrit en partant de l'exon 2 du gène (figure 1.10).

Chez la souris, une quinzaine de mutations affectant le gène *Hr*, a été décrite, mais seule une poignée d'entre elles ont été analysées au niveau moléculaire. Le premier mutant *hr* étudié comportait l'insertion d'un provirus au niveau de l'intron 6 [170]. Des mutations faux sens ont été identifiées au niveau de l'exon 4 chez les souris *hr^{rhChr}* et *hr^{rh-8J}* [172, 173] et de l'exon 12 chez les souris *hr^{rhl}* [174]. De plus la mutation *hr^{rhY}* consisterait en une insertion de 13 pb de l'exon 16 [175]. La mutation, *hr^{rhTgN5053Mm}* serait due à l'insertion d'un transgène au niveau de l'exon 14 [176]. Enfin, comme il a été mentionné plus haut, notre équipe a mis en évidence une mutation causée par une délétion de 296 pb au niveau de l'exon 19 [177]. Toutes les mutations répertoriées sur ce gène entraînent un phénotype alopécique avec parfois des troubles plus subtiles au niveau de l'oreille interne, du système immunitaire et du système

reproductif.

Le gène *hairless* chez l'Homme présente une forte homologie de séquence avec ceux clonés chez le rat et la souris. Situé sur le chromosome 8p21.2, le gène *hairless* humain s'étend sur plus de 14 kb et s'organise également en 19 exons [143]. Tout comme chez les souris, de nombreux variants alléliques du gène *hairless* humain ont été mis en évidence. Dans la plupart des cas, ces anomalies consistent en des mutations ponctuelles ou des délétions [178, 179, 180, 181, 171, 182, 183, 184, 185]. Chez l'homme on note de plus quelques cas de retard mental [166, 186, 187]. Comme chez la souris, l'ensemble de ces mutations est associé à une perte totale et irréversible des poils.

1.3.1.1.2 La protéine Hairless

Le gène *hairless* code pour une protéine de 1182 acides aminés d'un poids moléculaire de 127 kDa (figure 1.11). Cette protéine possède un signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa partie N-terminale, entre les acides aminés 409-427, et un motif à doigt de zinc putatif qui supposerait une fonction de fixation à l'ADN [188]. La protéine HR est d'ailleurs fortement associée à la matrice nucléaire [189]. Ce motif à doigt de zinc est du type Cys-Xaa₂-Cys-Xaa₁₈-Cys-Xaa₂-Cys et se situe entre les acides aminés 595 et 620. Des données biochimiques récentes montrent que Hairless joue un rôle de corépresseur de transcription pour les récepteurs nucléaires d'hormones [165, 190]. De plus, une analyse par délétion de motifs fonctionnels putatifs a montré que la protéine Hairless possédait trois domaines de répression indépendants appelés RD1 (entre les acides aminés 236-450), RD2 (entre les acides aminés 750-864) et RD3 (entre les acides aminés 864-980). Ces domaines seraient peut-être aussi responsable d'une répression de gènes cibles [165].

Pour assurer sa fonction de corépresseur, la protéine Hairless s'associe avec plusieurs partenaires protéiques sur des gènes cibles. Parmi ces partenaires il y a le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR), le récepteur de la vitamine D (VDR) et les récepteurs de l'acide rétinoïque (RORs) [191, 133, 192, 193]. Ainsi HR possède deux domaines d'interactions avec la protéine VDR, deux domaines avec TR et enfin deux domaines avec ROR α (pour revue [194]).

De plus, des études biochimiques ont confirmé qu'*in vivo*, Hairless existait dans un complexe multi-protéique contenant les histones déacétylases (HDACs) 1, 3 et 5 qui sont des protéines de remodelage de la chromatine impliquées dans la répression de la transcription [165, 168, 195] (figure 1.11). Compte tenu de ces données, il paraît clair que les mécanismes de répression de la transcription contrôlés par Hairless reposent aussi sur l'activité histone déacétylase des complexes qui associent *in vivo* à HR aux protéines TRs, VDRs, RXRs et les HDACs. Enfin récemment des études comparatives de séquences ont pu mettre en évidence la présence d'un domaine JmJc sur la partie C-terminale de la protéine [196]. Les domaines de types Jumonji ont été caractérisés comme ayant une activité histone déméthylase et pouvant ainsi réprimer la transcription [197, 198, 199].

J'entrerais plus dans le détail de ces partenaires dans le chapitre consacré aux partenaires et domaines d'interactions de la protéine.

1.3.1.2 Profil d'expression d'*Hairless*

Chez la souris, le gène *hairless* s'exprime à partir du 11,5^{ème} jour de gestation. Son activité la plus importante est détectée au niveau des placodes épidermiques, qui constituent les primordia des vibrisses et des follicules pileux. D'autres zones d'expression apparaissent à des stades plus tardifs (de E14,5 à E16,5) au niveau du cerveau, de la rétine et des nerfs optiques, ainsi que dans les poumons et dans les épithéliums de la langue et du côlon [166]. Chez les nouveau-nés, le transcrit ARNm est présent d'abord dans les couches suprabasales de l'épiderme et au centre de la partie distale du bourgeon du poil. Ensuite, deux nouvelles zones d'expression apparaissent au niveau de la matrice du poil en formation et dans la gaine interne du follicule pileux [200]. Au cours des trois phases du cycle du poil, les profils d'expression varient de façon dynamique. Au fur et à mesure de la progression en phase anagène, *Hr* est exprimé dans la couche cellulaire de la gaine externe du follicule, puis son expression se concentre au niveau des cellules de la matrice du poil. En phase catagène, une nouvelle zone d'expression est détectée au niveau de la gaine externe qui entoure l'extrémité proximale de la tige du poil. Au stade télogène, le gène *hairless* s'exprime dans quelques cellules appartenant au cordon de cellules épithéliales qui relie la papille dermique au reste du follicule [200]. Ces patrons d'expression suggèrent que le gène *hairless* serait un facteur clé dans la coordination de processus cellulaires tels que la formation de la racine du poil, le maintien de l'intégrité de la papille dermique ou la désintégration des gaines épithéliales du poil au cours du stade catagène. L'expression du gène *hairless* est donc finement régulée dans le temps et dans l'espace, et la majorité des structures affectées chez les mutants sont des sites d'une forte activité de transcription de ce gène. De manière plus subtile, la protéine HR qui est absente pendant la croissance active du poil, est détectée en grandes quantités à l'entrée de la phase catagène. De plus, elle se localise dans la gaine externe au niveau du bulge et dans la matrice du follicule pileux. Elle est par contre absente de la papille dermique. Toute l'ORS est positive pour la protéine HR en phase catagène et le signal persiste en telogène et lors du début de l'anagène. Une fois le bulbe folliculaire formé au milieu de l'anagène, la protéine HR disparaît, ce qui suggère un double rôle dans la régression et dans la réapparition du follicule [157]. Le fait que la protéine HR se retrouve dans des cellules positives pour des marqueurs de cellules souches comme K14 et CD34, aussi bien dans le bulge que dans la matrice pileuse, est en faveur d'une fonction du gène *Hr* dans le choix, par les cellules souches, d'une destinée de précurseurs de kératinocytes.

1.3.2 Les phénotypes Hairless et ses mutants

1.3.2.1 Les phénotypes cutanés associés aux mutants hairless

Le principal phénotype chez les mutants est une perte progressive et définitive du poil après la naissance. La première pousse semble normale. Chez les souris, l'alopecie se développe de l'avant vers l'arrière du corps. Trois semaines après la naissance les souris ont perdu tout leur pelage. Seules les vibrisses au niveau du museau persistent [175]. A partir de la quatrième semaine post-partum la peau a tendance à s'épaissir et à former des replis cutanés, particulièrement prononcés au niveau du museau [175, 201]. Un autre phénotype touche les griffes des souris. Chez certains mutants elles s'allongent énormément et se recourbent [202, 203].

1.3.2.1.1 Au niveau du follicule pileux

La première caractéristique observable chez les mutants hairless est un élargissement de la partie supérieure des follicules pileux. Cette dilatation progresse dans le sens distal et la cavité folliculaire se remplit de matériel corné. L'examen détaillé de l'épiderme mutant indique que la gaine externe et la gaine interne du follicule perdent leur intégrité. De plus l'organisation des couches cellulaires est gravement perturbée : les gaines se désagrègent, et la tige du poil perd son ancrage [204]. Après la première pousse du poil, le follicule se désintègre donc en laissant derrière lui deux malformations typiques : des utricules au niveau de l'épiderme et des kystes dermiques en profondeur. Les utricules, ou petites poches épithéliales remplies de matériel corné et de kératinocytes en dégénérescence, peuvent communiquer avec les kystes profonds [177]. Ils proviendraient de la partie dite « permanente » du follicule [205, 206, 207]. Avec l'âge, ces utricules auraient tendance à s'élargir [169]. Les kystes eux, seraient plutôt issus de la partie proximale du follicule une fois celui-ci désagrégé [205]. Le nombre et le volume de ces kystes augmentent avec l'âge, et vont donner chez la souris des replis et des rides cutanés typiques pour les variants appelés « rhinocéros » (figure 1.12).

Un autre point de cette pathologie concerne les glandes sébacées qui présentent des anomalies. Chez les mutants hairless et Yurlovo, les glandes sébacées migrent vers le pôle proximal de l'utricule et grossissent fortement durant les six premiers mois de vie postnatale [175]. Chez les mutants rhino, par contre, elles disparaissent progressivement.

Quelques modifications sont aussi à noter au niveau du bulge. Chez les souris hairless et Yurlovo, on trouve des cellules indifférenciées à côté des glandes sébacées probablement originaires des cellules souches du bulge. Les cellules souches du bulge ont totalement disparues chez les mutants rhino.

Enfin, en ce qui concerne la papille dermique, elle disparaît chez les mutants hairless. Des études montrent la présence de résidus fibroblastiques qui pourraient être des restes de cette papille [208, 209].

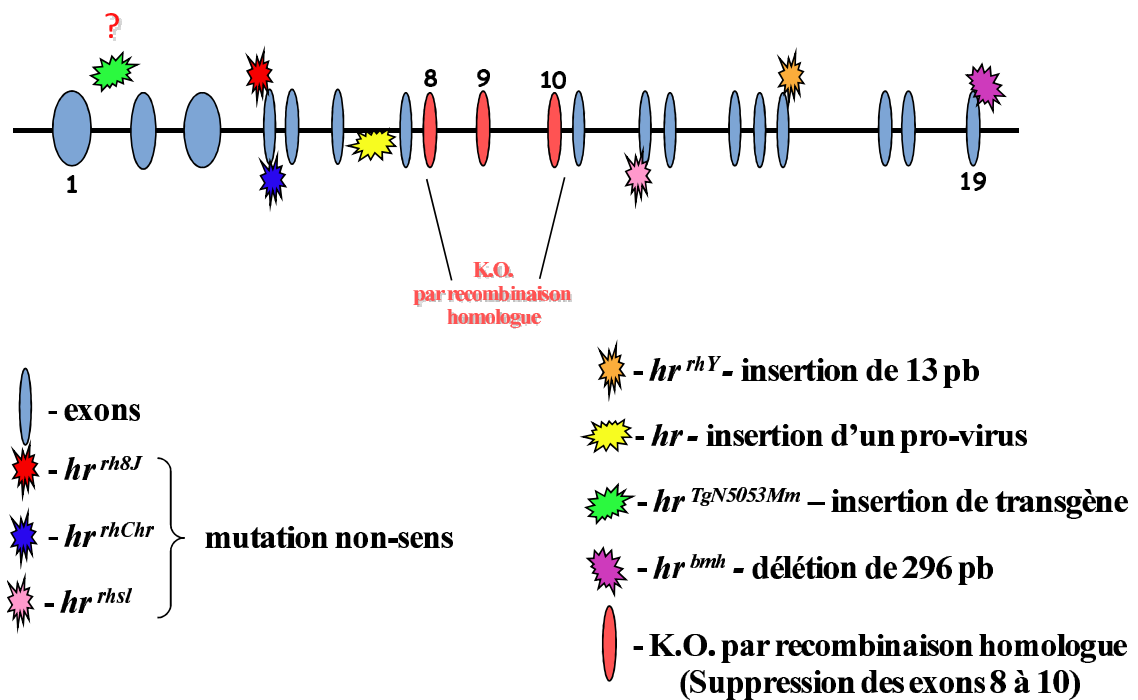


FIGURE 1.10 – Le gène *hairless* chez la souris et les différentes mutations identifiées

Le gène *hairless* est constitué de 19 exons et s'étend sur une longueur génomique d'environ 20 kb. À ce jour, une douzaine de lignées mutantes ont été répertoriées, mais l'altération génique précise n'a été identifiée que dans les cas présentés sur cette figure.

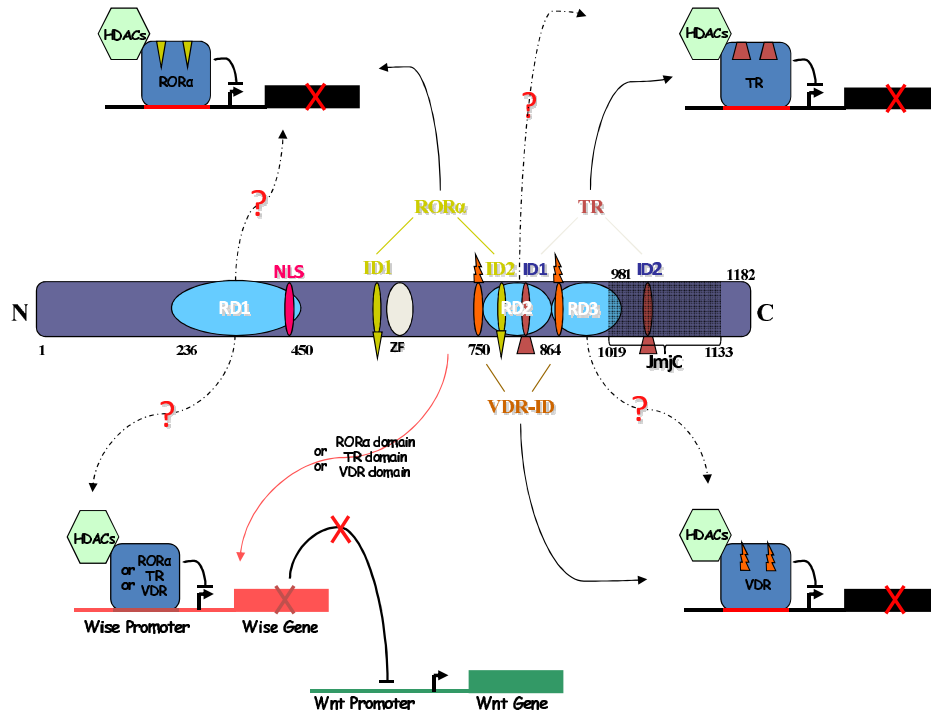


FIGURE 1.11 – Structure de la protéine Hairless

Chez la souris, la protéine Hairless (HR) est composée de 1182 acides aminés et présente une masse moléculaire de 127 kDa. Morphologiquement, la protéine Hairless ne possède pas de motifs structuraux distinctifs, à l'exception d'une séquence putative à doigt de zinc entre les acides aminés 595 et 620 (ZF). La protéine Hairless se localise dans le noyau, grâce à une séquence signal de localisation nucléaire bipartite (NLS, *nuclear localisation signal*), située entre les acides aminés 409 et 427. Des domaines d'interaction avec des récepteurs nucléaires d'hormones ont été identifiés dans la protéine Hairless de rat qui présente 95% d'identité avec celle de la souris : les domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires de l'hormone thyroïdienne (TR) sont situés entre les acides aminés 750 et 864 (TR-ID1) et les acides aminés 980 et 1084 (TR-ID2). La région située entre les acides aminés 750 et 864 comprend également le domaine d'interaction avec le récepteur de la vitamine D (VDR-ID), ainsi que les motifs LXXLL capables d'interagir avec le récepteur α -orphelin des rétinoïdes (ROR α -ID). La protéine Hairless serait un corépresseur. Des analyses fonctionnelles ont révélé l'existence de trois domaines de répression, RD1, RD2, RD3, situés entre les acides aminés 236 et 450, 750 et 864, et 864 et 980, respectivement. Enfin il existe un domaine JmjC situé entre les acides aminés 1019 et 1133. Est représenté les différentes voies de répression faisant appel aux partenaires connus d'Hairless. La protéine HR est également capable de réguler la voie Wnt en réprimant le gène *Wise*, un inhibiteur de la voie Wnt.

1.3.2.1.2 Les mutants chez l'homme et les phénotypes associés

Chez l'homme, cette anomalie conduit à une perte des poils, des cheveux, des cils et des sourcils dans les premiers mois après la naissance quel que soit le type de mutation [143]. Dans quelques cas, les patients peuvent garder leurs cils et sourcils, en développant avec l'âge des granulomes cutanés au niveau des kystes dermiques [182, 210].

Un nombre croissant de variants alléliques du gène *hairless* ont été identifiés et décrits dans l'espèce humaine. Depuis environ trois ans une dizaine de nouvelles mutations ont été répertoriées [211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218]. Dans la plupart des cas, elles résultent d'altérations ponctuelles, délétions ou insertions. Cette dystrophie a été répertoriée sous les termes d'alopécie universelle congénitale (*alopecia universalis*) (OMIM#203655) ou atrichose à papules (OMIM#209500). Son occurrence reste extrêmement rare chez l'homme [143, 219]. Les individus affectés proviennent généralement de mariages consanguins. Une dizaine de familles, avec à peine une centaine d'individus à alopécie totale, ont été décrits dans le monde. Une étude a montré que du point de vue morphologique et histologique, le phénotype chez l'espèce humaine était similaire à celui décrit chez les souris *hairless* [220].

En résumé, aussi bien chez l'homme que chez la souris, le défaut majeur chez les mutants est l'incapacité du follicule pileux à initier son propre renouvellement cyclique. Or la mise en place, le maintien et le cycle des follicules pileux résultent d'un ensemble de processus complexes faisant intervenir, à chaque étape, de profonds remaniements cellulaires finement régulés. L'analyse par des approches de haut débit a révélé plus d'une centaine de protéines structurales et régulatrices localisées de façon spécifique dans les compartiments épidermiques et la papille folliculaire mésenchymateuse [127].

1.3.2.2 Les autres organes affectés chez la souris

De nombreuses études font état d'anomalies au niveau du système immunitaire chez les mutants *hairless* [204]. Chez des souris *hairless* âgées de deux mois, les stades tardifs de la différenciation thymocytaire sont sévèrement affectés [221]. Les souris Yurlovo, dont l'espérance de vie ne dépasse pas six mois, ont une involution et une disparition du thymus entre le troisième et le sixième mois [204]. Chez les mutants *rhino-j*, on constate des défauts du système immunitaire, en particulier dans les fonctions des cellules T-auxiliaires et des macrophages, souvent accompagnés d'une atrophie de la région corticale du thymus dès le troisième mois après la naissance [222]. En revanche, les souris *hairless bald* Mill Hill ne présentent aucune anomalie de la différenciation ou de la maturation des thymocytes [177]. Si les mâles *hairless* et *rhino* sont apparemment féconds, les mutants *rhino* Yurlovo perdent leur capacité de reproduction vers l'âge de 4-5 mois, et montrent une diminution du poids de leurs testicules [175, 223, 224]. En règle générale, les femelles qui portent des mutations du gène *hairless* présentent des anomalies de la reproduction mal élucidées, qui vont souvent jusqu'à l'infertilité complète et définitive. Ces femelles

sont caractérisées par des troubles du fonctionnement des glandes mammaires, ou par des anomalies pathologiques de leur cycle ovarien et du cycle de l'épithélium utérin [225]. De plus, les femelles mutantes présentent des anomalies dans leur comportement maternel : elles ne s'occupent pas de leurs petits, et sont incapables de les nourrir ou de les élever [226, 201]. Au niveau du système nerveux central, la rétine, le cervelet et l'oreille interne sont souvent affectées chez les souris rhino. Il a ainsi été établi que la couche plexiforme interne et la couche ganglionnaire de la rétine sont fortement réduites chez des individus homozygotes. L'analyse de la structure du cerveau chez les mutants rhino-j indique que le gène *hairless* est impliqué dans la maturation et le maintien de la différenciation du cortex du cervelet [187]. Chez les mutants adultes, la taille, la morphologie et l'immunoréactivité pour des marqueurs neuronaux (NFP et CB) des cellules de Purkinje sont modifiées, la mutation semblant être liée à une accélération du vieillissement du cervelet [187]. Enfin, au niveau de l'oreille interne, une perte de grands neurones ganglionnaires de la cochlée, accompagnée par des anomalies de l'épithélium sensoriel, a souvent été observée chez les mutants. De plus, une hyperprolifération de l'épithélium du colon est notée chez les souris *hr^{rh}* [166]. L'anomalie semble liée à une augmentation du nombre de villosités intestinales et du diamètre de la muqueuse musculaire de l'intestin des mutants. Cette variété de phénotypes multiples, qui accompagnent la perte du poil, illustre les fonctions multiples du gène *hairless* au cours du développement, un gène dont la régulation, les partenaires et les cibles sont encore bien méconnus.

1.3.3 Mode d'action de la protéine Hairless : les partenaires protéiques et les gènes cibles

La protéine Hairless agit comme un corépresseur de la transcription. A l'heure actuelle son principal mode d'action consiste à lier des partenaires protéiques et à agir, dans ces complexes, comme un inhibiteur de la transcription de gènes cibles. Je vais détailler ci-après tous les partenaires protéiques connus et les gènes cibles de ces complexes multi-protéiques.

1.3.3.1 Les Récepteurs nucléaires d'hormones

Les récepteurs nucléaires d'hormones sont des facteurs de transcription qui agissent grâce à une liaison avec des ligands lipophiles [227, 228, 229]. Les récepteurs de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque vont réprimer la transcription en l'absence de leurs ligands [230].

Il y a une dizaine d'années, des études ont montré que la protéine HR pouvait interagir spécifiquement avec les récepteurs nucléaires TR α et TR β [167, 190] au niveau du système nerveux central. Il existe deux sites d'interactions identifiés sur la protéine, au niveau des acides aminés 816-830 (TR-ID1) et 1024-1040 (TR-ID2). Ces régions seraient capables d'interagir avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs TR [231]. De la même façon, des interactions avec le récepteur orphelin de l'acide rétinoïque, ROR α (Retinoic acid related Orphan nuclear Receptor α), [231] et le récepteur de la vitamine D, VDR, [191] ont aussi été mis en évidence. Il faut noter que VDR se lie à Hairless spécifiquement dans la peau

et le follicule pileux. De plus, une étude [135] a montré que des souris KO pour le gène *Vdr* présentaient un phénotype alopecique avec apparition d'utricules et de kystes au niveau du derme, similaire à celui du gène *hairless*. En ce qui concerne le ROR α , l'interaction avec HR se fait grâce à deux motifs de type LXXXL situés au niveau des acides aminés 568 (ROR-ID1) et 784 (ROR-ID2). Au niveau de VDR, les acides aminés impliqués dans l'interaction avec HR se situent au niveau de la position 750 (VDR-ID1) et 864 (VDR-ID2) [191].

Lorsque la protéine Hairless interagit avec ces récepteurs nucléaires d'hormones il y a une répression de l'activité des gènes ciblés. HR est donc un corépresseur de transcription [165, 190].

1.3.3.2 Les histones déacétylases

La transcription des gènes est finement régulée au niveau de la chromatine par les facteurs de remodelage qui sont responsables de la modification de l'ADN et des histones. Plusieurs protéines permettent la modification post-traductionnelles des histones, ce qui entraîne une accessibilité plus ou moins grande à l'ADN. Les HDACs (pour Histone Déacétylases) font partie de ces protéines capables de remodeler la chromatine en modifiant les histones. Leur action entraîne la compaction de la chromatine ce qui provoque une inhibition des gènes de cette région. Or, la protéine Hairless est capable d'interagir avec certaines protéines de la famille des HDACs [165], et notamment aux HDACs 1, 3 et 5 [168]. Lorsque HR est associé aux HDACs, elle est capable de réprimer la transcription de gènes cibles (figure 1.13A).

1.3.3.3 Hairless et les gènes *Hox*

Des résultats de notre laboratoire, obtenus à partir du croisement de mutants *hairless* avec des souris transgéniques, suggèrent l'existence d'une relation, directe ou indirecte, entre la protéine Hairless et les membres du complexe Hox [177]. Chez les mutants *bald Mill Hill*, l'expression du marqueur transgénique *Hoxb4/LacZ* au niveau des placodes épidermiques est absente, ou confinée à quelques cellules seulement. Ces données indiquent que le gène *hairless* pourrait être spécifiquement impliqué dans l'organisation de la placode du follicule pileux, dès les premiers stades de son expression au niveau de l'embryon en développement. Il est possible d'imaginer que la morphogenèse normale du follicule pileux et sa polarité antéro-postérieure ou proximo-distale, qui dépendent du code Hox régional, soit également sous la dépendance de facteurs ou cofacteurs intervenant au niveau de chaque structure embryonnaire. De plus, la surexpression de la protéine HOXB4 dans des cultures primaires de cellules au stade nouveau-né affecte spécifiquement la prolifération des kératinocytes, et altère l'expression des molécules d'adhésion présentes à leur surface[232].

1.3.3.4 La signalisation Wnt

De très récents travaux établissent une association fonctionnelle entre Hairless et la voie Wnt. L'invalidation du gène *hairless* par recombinaison homologue suggère que l'intégrité de la protéine est né-



FIGURE 1.12 – **Phénotype des mutants hairless**

Deux semaines après la naissance, les mutants développent une alopécie de l'avant vers l'arrière de leurs corps qui aboutit à la perte totale et irréversible du pelage. Avec l'âge, la peau des animaux mutants a tendance à s'épaissir et à former des replis cutanés, particulièrement prononcés au niveau du museau. Chez l'homme atteint de cette mutation, nous observons aussi une chute définitive des poils et cheveux, quelques mois après la naissance.

cessaire pour le déroulement correct de la migration des cellules souches. Cela a été confirmé par le comportement de marqueurs de la différenciation et par l'analyse du transcriptome des kératinocytes des souris invalidées [233]. En ciblant l'expression de la protéine HR sauvage dans les précurseurs des kératinocytes, il est possible de corriger le phénotype *hairless* et de rétablir de façon durable et définitive le cycle du poil chez des souris *hr*^{-/-}. Une autre étude de la même équipe a permis de montrer que *Hairless* contrôlait la signalisation Wnt en réprimant l'expression du gène *Wise*, un inhibiteur bien connu de la voie Wnt, capable de réprimer *Wnt10b* [157]. L'expression du gène *Wise* est parfaitement inversée spatialement et dans le temps par rapport à l'expression de la protéine *Hairless* [157] (figure 1.13B). La fonction du gène *Hr* et la voie de signalisation Wnt seraient donc liées et fournirait un mécanisme moléculaire pour réguler spatialement et temporellement la localisation de la signalisation Wnt requise pour la réinitialisation du cycle pileux. De plus la fonction du gène *hairless* ne serait pas nécessaire pendant la morphogenèse du follicule pileux soit parce que l'ectoderme ne serait pas soumis à l'influence de cette inhibiteur Wnt, soit parce que la signalisation Wnt serait régulé par un autre facteur dans ce contexte.

Un second candidat possède une expression similaire à *Wise* [194, 234]. Il s'agit du gène *Soggy*. Même si la protéine *Soggy* n'a pas encore de fonction clairement défini, elle serait équivalente à la protéine Dickkopf-3 (de la famille Dickkopf), une autre famille d'inhibiteurs de Wnt [234].

1.3.3.5 Les histones déméthylases à domaine JmJC (Jumonji)

Récemment une nouvelle famille de protéine pouvant déméthyliser les histones a été découverte [199], il s'agit des protéines de la famille JHDM (JmJC domain-containing histone demethylase) contenant un domaine JmJC. Ce domaine permet la déméthylation des histones et répriment la transcription des gènes cibles. Il arrive, suivant le résidu déméthylé sur les histones, qu'elles soient au contraire responsables de l'activation de la transcription [235, 199, 236].

Il faut noter que sur sa partie C-terminale, entre les acides aminés 1019 et 1133, la protéine *Hairless* abrite un domaine JmJC putatif [196]. A l'heure actuelle, aucune donnée ne permet de conclure sur une possible activité de ce domaine dans la protéine HR. Pourtant, chez le rat, deux études montre que lorsque l'on mute spécifiquement trois résidus contenus dans ce domaine JmJC, l'activité répressive d'*Hairless* est perdue [237, 194]. Si le domaine JmJC de la protéine HR avait une activité enzymatique similaire à celle des JHDM, une partie de la fonction de répression de *Hairless* pourrait être directement lié à la méthylation des histones. Cette répression par la méthylation pourrait alors être elle-même contrebalancée par des activateurs comme CARM-1 et PRMT-1 et ainsi fournir un contrôle additionnel à l'activité transcriptionnelle due aux modifications d'histones [238, 239]. De plus, dans la protéine HR *bmh* qui fait l'objet de ce travail de thèse et dont la fonction est au centre de nos intérêts, une séquence additionnelle de 117 acide aminés est en continuité avec le domaine Jumonji [240], ce qui offre une nouvelle possibilité de fonction dans l'arsenal du répresseur HR.

En conclusion, cette revue de la littérature récente sur la participation du gène *Hr* dans le contrôle du cycle pilaire rend compte du besoin d'accumuler de nouveaux faits expérimentaux et mettre en place des stratégies pour élucider une pathologie connue (hairless) en termes de concepts nouveaux (dialogue de signalisations et de destinée de cellules souches). Comme le montre la suite du manuscrit, mon travail de thèse a essayé de fournir quelques éléments pour mieux comprendre l'énigme des mutants hairless.

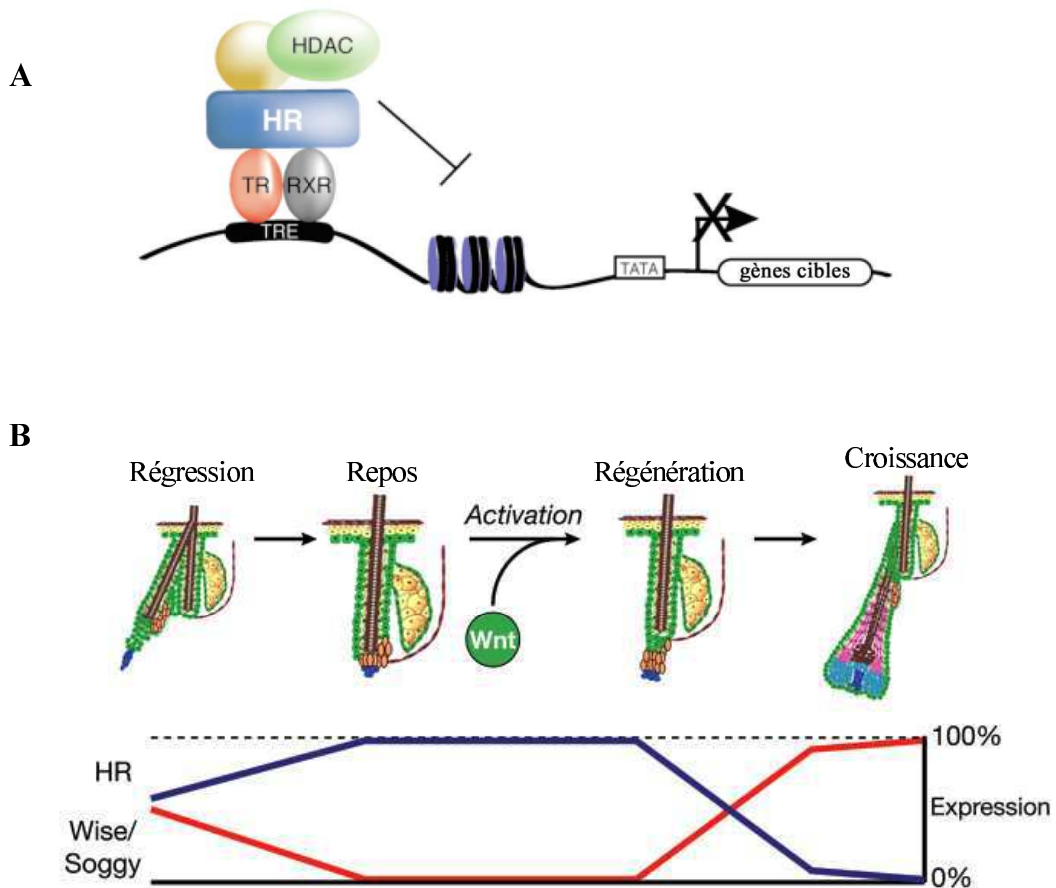


FIGURE 1.13 – Régulation de l'expression de gène par Hairless

(A) Représentation schématique de la fonction de corépresseur d'HR. Hairless interagit avec l'hétérodimère TR/RXR et va lier l'ADN sur un élément de réponse au récepteur de l'hormone thyroïdienne (TRE). HR est aussi associé à des HDACs. Cette association pourrait modifier la structure de la chromatine ce qui a pour résultat de réprimer la transcription. Le rond sans désignation représente les protéines putatives fixant ce complexe. (B) Modèle d'action pour la repousse du poil. La regression (catagène) se caractérise par l'activation d'Hairless et la répression en réponse de l'ARNm de Wise et Soggy. L'expression de la protéine HR permet l'activation du Wnt dans le bulge. En conséquence à la repousse, la protéine HR est inhibée pendant que la transcription de Wise et Soggy augmente. La signalisation Wnt est donc à nouveau réprimée (modifié d'après [194]).

1.4 Revue bibliographique

J'ai participé à la rédaction d'une revue écrite et publiée en 2006 dans *Medecine Sciences* [241], ci-jointe.

► Le gène *hairless* (*hr*) des mammifères code pour une protéine nucléaire impliquée dans le contrôle du renouvellement du follicule pileux. Cette protéine est un cofacteur de récepteurs nucléaires d'hormones qui régulent la transcription de gènes cibles au cours de la différenciation de l'épiderme et du cycle du poil. La protéine Hairless (HR) fait partie de grands complexes multiprotéiques capables de réprimer la transcription, en association avec des facteurs de remodelage de la chromatine comme les histones désacétylases. Chez les mammifères, le locus *hairless* est la cible de nombreuses mutations alléliques dont les effets sont pléiotropiques. Ces altérations entraînent l'apparition d'un phénotype cutané complexe, caractérisé par la perte progressive et irréversible d'un pelage d'apparence normale au cours des premières semaines de vie post-natale. L'analyse de la littérature sur le gène *hairless* chez la souris et chez l'homme permet d'attribuer des différences morphologiques spécifiques à chaque mutant, aussi bien au niveau de l'épiderme et du follicule pileux que dans d'autres tissus où le gène est exprimé au cours du développement. Ces résultats suggèrent que l'intégrité du gène *hairless* est requise pour le déroulement correct de la morphogenèse d'organes aussi différents que l'épiderme, l'oreille interne, l'ovaire ou le thymus. Le gène *hairless* semble ainsi faire partie de circuits et de cascades d'interactions géniques dont le contrôle moléculaire est fondamentalement inconnu. La variété des phénotypes alléliques souligne l'importance de l'analyse moléculaire du locus *hairless* pour identifier les altérations géniques impliquées dans les différentes mutations détectées. Les recherches concernant la mutation *hairless* ont été particulièrement dynamiques pendant les dernières années, depuis que l'homologue de ce gène a pu être mis en évidence chez l'homme. Cependant, un

Le gène *hairless* de la souris

Fonctions à la racine du poil et au cœur d'une subtile pléiotropie

Stefan Nonchev, Maud-Virginie Brancaz, Eric Folco, Yannick Romero, Rabah Iratni



Laboratoire de Biologie moléculaire et cellulaire de la différenciation, Inserm U309, Institut Albert-Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France. snonchev@ujf-grenoble.fr

bon nombre de questions reste en suspens, notamment quant au site exact d'activité du gène *hairless* au sein des nombreuses populations cellulaires du follicule pileux, son rôle précis au cours de la morphogenèse, sa localisation au sein des voies de signalisation, ainsi que l'identité des partenaires et des cibles de la protéine Hairless. ◀

La perte d'un pelage d'apparence normale vers la fin de la troisième semaine de vie post-natale est le caractère marquant de la souris *hairless*. Des mutants spontanés *hairless* sont observés et étudiés depuis plus d'un siècle, et des lignées de souris *hairless* ont été systématiquement élevées et maintenues en laboratoire dans les années 20 ; depuis cette période, un certain nombre de variants alléliques ont été identifiés [1]. La souris *hairless* a été un excellent modèle en dermatologie, pour étudier les différents types d'alopécie et évaluer l'activité et l'absorption cutanée des médicaments, ainsi que dans l'analyse de la formation des rides. L'utilisation de ces mutants permet d'explorer les effets

Article reçu le 22 juillet 2005, accepté le 23 janvier 2006.

protecteurs des anti-oxydants sur la peau et les étapes successives de la progression tumorale induite par les agents chimiques ou les rayons UV, ainsi que d'étudier divers aspects de la physiologie de la peau et du processus de vieillissement [2-4].

Cependant, les fondements moléculaires et cellulaires de cette mutation, l'identification du gène *hairless* lui-même, ainsi que l'analyse de son rôle biologique n'ont été abordés que très récemment. En effet, les recherches sur les différents variants alléliques ne se sont dynamisées que ces dernières années, depuis que le gène *hairless* a été cloné chez la souris, et surtout que l'homologue de ce gène a été identifié chez l'homme [5, 6].

Le locus *hairless* des mammifères

Le gène *hairless* (*hr*) est remarquablement conservé chez les mammifères. L'homologie des séquences codantes chez la souris, le rat, l'homme, le singe, le chien, le porc et le mouton varie entre 70 % et 80 %, et atteint 82 % dans les cas de la souris et de l'homme [6] ; cette conservation témoigne d'un rôle essentiel chez les mammifères, et qui leur est spécifique : de fait, des recherches menées *in silico* n'ont pas permis d'identifier des orthologues de *hairless* dans divers phylums majeurs de vertébrés ou d'invertébrés. Il est donc possible que le gène *hairless* n'existe que chez les mammifères, et que sa fonction soit intimement liée à l'apparition du pelage au cours de l'évolution. Le gène *hairless* est situé sur le chromosome 14 chez la souris et sur le chromosome 8 chez l'espèce humaine. Chez l'ensemble des mammifères analysés, ce gène s'étend sur une séquence génomique d'environ

20 kb. Il est organisé en 19 exons et sa transcription produit un ARNm d'environ 5 kb [7]. Bien que de nombreux variants alléliques aient été identifiés chez la souris, la nature précise des altérations affectant le gène *hairless* n'a pu être identifiée que dans quelques cas sur une douzaine de lignées mutantes obtenues et décrites à ce jour (Figure 1) : le mutant *hr* original comporte l'insertion d'un provirus au niveau de l'intron 6 [8] ; la mutation *hr^{rhY}* consisterait en une insertion de 13 pb dans l'exon 16 [9] ; la mutation *hr^{rhTgN5053Mm}* serait due à l'insertion d'un transgène au niveau du locus *hairless* [10] ; les souris bald Mill Hill présentent, quant à elles, une délétion de 296 pb à l'extrémité 3' de l'exon 19 du gène [11] ; enfin, des mutations faux-sens ont été identifiées au niveau des exons 12 et 4 chez les souris *hr^{rhsl}*, *hr^{rhChr}* et *hr^{rhBj}* [12-14].

Chez l'homme, l'atrachose généralisée (absence totale de poils et de cheveux) est une pathologie à hérédité autosomique récessive. Tout comme chez les souris, un certain nombre de mutations du gène *hairless* humain ont été mises en évidence [15] : dans la plupart des cas, ces anomalies consistent en altérations ponctuelles, délétions ou insertions. Le désordre, répertorié sous les termes d'alopécie universelle congénitale (OMIM#203655) ou atrachose à papules (OMIM#209500), reste extrêmement rare chez l'homme [16] : les individus affectés proviennent généralement de mariages consanguins, et une dizaine de familles, avec à peine une centaine d'individus à alopécie totale, ont été décrits dans le monde.

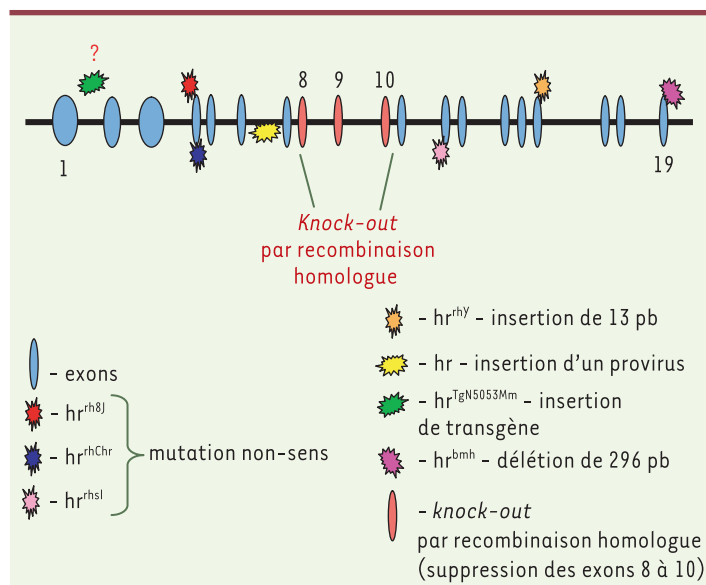


Figure 1. Le gène *hairless* chez la souris et les différentes mutations identifiées. Le gène *hairless* est constitué de 19 exons et s'étend sur une longueur génomique d'environ 20 kb. À ce jour, une douzaine de lignées mutantes ont été répertoriées, mais l'altération génique précise n'a été identifiée que dans les cas présentés sur cette figure.

Expression du gène *hairless* au cours du développement et dans le cycle pileux

Chez la souris, le gène *hairless* s'exprime dès le jour E11,5 dans l'épiderme embryonnaire. Son activité est notamment détectée au niveau des placodes épidermiques, qui constituent les primordia des vibrisses et des follicules pileux. D'autres zones d'expression apparaissent, à des stades plus tardifs (E14,5-E16,5), au niveau du cerveau, de la rétine et des nerfs optiques, ainsi que dans les poumons et dans les épithéliums de la langue et du côlon [17]. Chez les nouveau-nés, l'ARNm est présent d'abord dans les couches suprabasales de l'épiderme et au centre de la partie distale du bourgeon du poil. Ensuite, deux nouvelles zones d'expression apparaissent au niveau de la matrice du poil en formation et dans la gaine interne (GI) du follicule pileux [18].

Au cours des trois phases du cycle du poil (anagène, phase de croissance ; catagène, phase de régression ; et télogène, phase de repos) (→), les profils d'expression varient de façon dynamique : au fur et à mesure de la

(→) m/s
2006, n° 2
p. 138

progression en phase anagène, *hr* est exprimé dans une fine couche cellulaire de la gaine externe (GE), puis son expression se concentre au niveau des cellules de la matrice du poil ; en phase catagène, une nouvelle zone d'expression est détectée au niveau de la GE qui entoure l'extrémité proximale de la tige du poil ; en fin de régression pileuse et au stade télogène, le gène *hairless* s'exprime au niveau de quelques cellules appartenant au cordon de cellules épithéliales qui relie la papille dermique au reste du follicule [18]. Ces patrons d'expression suggèrent que le gène *hairless* serait un facteur clé dans la coordination de processus cellulaires tels que la formation de la racine du poil, le maintien de l'intégrité de la papille dermique ou la désintégration des gaines épithéliales du poil au cours du stade catagène. L'expression du gène *hairless* est donc finement régulée dans le temps et dans l'espace, et la majorité des structures affectées chez les mutants sont des sites d'une forte activité de transcription de ce gène.

Phénotype majeur et effets pléiotropiques des mutations du locus *hairless*

Follicule pileux

L'énigme fondamentale des mutants *hairless*, qui fascine les chercheurs depuis plus d'un siècle, est que le follicule pileux des mutants homozygotes, après avoir donné un premier poil d'apparence normale, soudain se désintègre en laissant derrière lui deux malformations typiques : des utricules au niveau de l'épiderme et des kystes dermiques en profondeur. La première caractéristique observable chez les mutants est un élargissement de la partie supérieure des follicules pileux. Cette dilatation progresse dans le sens proximal et la cavité folliculaire se remplit de matériel corné. L'examen détaillé de l'épiderme mutant indique que la GE et la GI du follicule perdent leur intégrité, et que l'organisation des couches cellulaires est gravement perturbée [3] : les gaines se désagrègent, et la tige du poil perd son ancrage. Les utricules, ou petites poches épithéliales remplies de matériel corné et de kératinocytes en dégénérescence, peuvent communiquer ou non avec les kystes profonds [11] ; le nombre et le volume de ces kystes augmentent avec l'âge, et vont donner chez la souris des replis et des rides cutanés typiques pour les variants « rhinocéros » (Figure 2).

Chez l'homme, cette anomalie conduit à une perte des poils, des cheveux, des cils et des sourcils dans les premiers mois après la

naissance. Les patients peuvent, rarement, garder leurs cils et sourcils, en développant avec l'âge des granulomes cutanés au niveau des kystes dermiques [19, 20]. Aussi bien chez l'homme que chez la souris, le défaut majeur évident chez les mutants est l'incapacité du follicule pileux à initier son propre renouvellement cyclique. Or la mise en place, le maintien et le cycle des follicules pileux résultent d'un ensemble de processus complexes faisant intervenir, à chaque étape, de profonds remaniements cellulaires finement régulés ; l'analyse par des approches de haut débit a révélé plus d'une centaine de protéines structurales et régulatrices localisées de façon spécifique dans les compartiments épidermiques et la papille folliculaire mésenchymateuse [21].

Organes affectés chez la souris

De nombreuses études font état d'anomalies au niveau du système immunitaire chez les mutants *hairless* : chez des souris *hairless* âgées de deux mois, les stades tardifs de la différenciation thymocytaire sont sévèrement affectés ; chez les souris Yurlovo, dont l'espérance de vie ne dépasse pas six mois, une involution et une disparition du thymus entre le troisième et le sixième mois ont été observées [9] ; chez les mutants rhino-j, on constate des défauts du système immunitaire, en particulier dans les fonctions des cellules T-auxiliaires et des macrophages, souvent accompagnés d'une atrophie de la région corticale du thymus dès le troisième mois après la naissance [22]. En revanche, les souris *hairless* bald Mill Hill ne présentent aucune anomalie de la différenciation ou de la maturation des thymocytes [11].

Si les mâles *hairless* et rhino sont apparemment féconds, les mutants rhino Yurlovo perdent leur capacité de reproduction vers l'âge de 4-5 mois, en même temps qu'ils présentent une diminution du poids de leurs testicules [9]. En règle générale, les femelles qui portent des mutations du gène *hairless* présentent des anomalies de la reproduction mal élucidées, qui vont souvent jusqu'à l'infertilité complète et définitive : ces femelles sont caractérisées par des troubles du fonctionnement des glandes mammaires, ou par des anomalies pathologiques de leur cycle ovarien et du cycle de l'épithélium utérin. De plus, les femelles mutantes présentent des anomalies dans leur comportement maternel : elles ne s'occupent pas de leurs petits, et sont incapables de les nourrir ou de les élever [23].

Au niveau du système nerveux central, la rétine, le cervelet et l'oreille interne sont souvent affectées

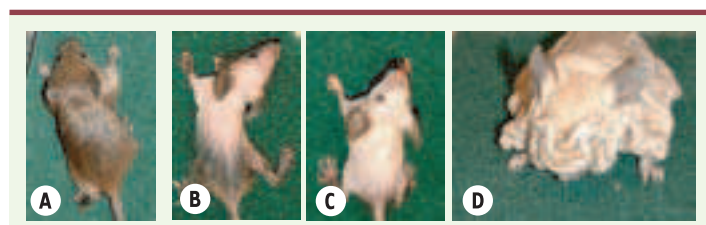


Figure 2. Phénotype des mutants *hairless*. A. La première pousse de poils est d'apparence normale. B, C. Deux semaines après la naissance, les mutants développent une alopecie de l'avant vers l'arrière de leurs corps (B) qui aboutit à la perte totale et irréversible du pelage (C). D. Avec l'âge, la peau des animaux mutants a tendance à s'épaissir et à former des replis cutanés, particulièrement prononcés au niveau du museau.

chez les souris rhino : il a ainsi été établi que la couche plexiforme interne et la couche ganglionnaire de la rétine sont fortement réduites chez des individus homozygotes ; l'analyse de la structure du cerveau chez les mutants rhino-j indique que le gène *hairless* est impliqué dans la maturation et le maintien de la différenciation du cortex du cervelet [24] ; chez les mutants adultes, la taille, la morphologie et l'immunoréactivité pour des marqueurs neuronaux (NFP et CB) des cellules de Purkinje sont modifiées, la mutation semblant être liée à une accélération du vieillissement du cervelet [24] ; enfin, au niveau de l'oreille interne, une perte de grands neurones ganglionnaires de la cochlée, accompagnée par des anomalies de l'épithélium sensoriel, a souvent été observée chez les mutants. En revanche, une hyperprolifération de l'épithélium du colon est notée chez les souris *hr^{rh}* [17] : l'anomalie semble liée à une augmentation du nombre de villosités intestinales et du diamètre de la muqueuse musculaire de l'intestin des mutants. Cette variété de phénotypes subtils, qui accompagnent la perte du poil, illustre les fonctions multiples du gène *hairless* au cours du développement, un gène dont la régulation, les partenaires et les cibles sont encore bien méconnus.

Hairless, une protéine au centre de plusieurs voies de signalisation

Un corépresseur des récepteurs nucléaires d'hormones

Chez la souris, la protéine Hairless (HR) est constituée de 1 182 acides aminés, pour une masse moléculaire de 127 kDa (Figure 3). La structure primaire de la protéine ne présente aucune homologie évidente avec des protéines aux fonctions connues, ce qui aurait permis de prédire son rôle.

Morphologiquement, Hairless ne possède pas de motifs structuraux distinctifs, à l'exception d'une séquence putative à doigt de zinc, entre les acides aminés 590 et 625, qui présente une certaine similitude avec les doigts de zinc des facteurs de transcription de la famille GATA ; bien que la fonctionnalité du motif n'ait encore jamais été abordée, sa conservation chez les mammifères souligne son importance au sein de la protéine. De plus, HR adopte une localisation nucléaire grâce une séquence signal de localisation nucléaire bipartite, située entre les acides aminés 409 et

427 ; l'analyse par fractionnement cellulaire confirme cette localisation nucléaire de la protéine HR, qui serait fortement associée à la matrice nucléaire [25].

Les premiers résultats de la dissection des domaines fonctionnels indiquent que les récepteurs nucléaires d'hormones comme les TR (récepteurs de l'hormone thyroïdienne), le VDR (récepteur de la vitamine D) ou les RAR (récepteurs de l'acide rétinoïque) compteraient parmi les partenaires privilégiés de la protéine HR : de fait, le gène *hairless* semble être une cible de l'hormone thyroïdienne dans le système nerveux central, et la protéine HR interagit directement avec les récepteurs nucléaires de cette hormone.

Deux domaines capables d'interagir avec les TR ont été identifiés, entre les acides aminés 750 et 864 (ID1) et 980 et 1 084 (ID2) [26]. La protéine HR se lie également au récepteur nucléaire orphelin ROR- α par l'intermédiaire de deux motifs LXXLL, situés entre les acides aminés 568 et 784 [27, 28]. Enfin, Hr interagirait physiquement avec VDR *in vitro* comme *in vivo*, par un domaine compris entre les acides aminés 750 et 864 [29].

Le rôle de HR dans toutes ces interactions serait celui d'un corépresseur : des analyses fonctionnelles récentes ont en effet révélé l'existence de trois domaines de répression au niveau de la protéine HR, RD1, RD2 et RD3, situés entre les acides aminés 236 et

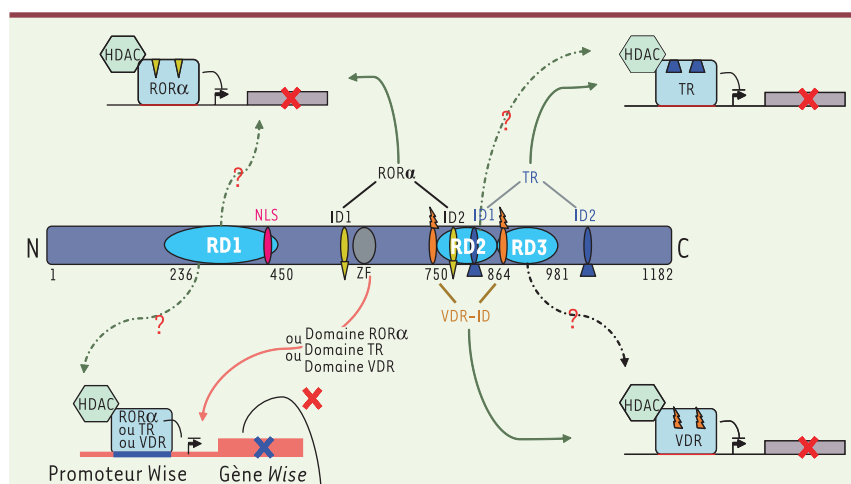


Figure 3. Structure de la protéine Hairless. Chez la souris, la protéine Hairless (HR) est composée de 1 182 acides aminés et présente une masse moléculaire de 127 kDa. Morphologiquement, la protéine Hairless ne possède pas de motifs structuraux distinctifs, à l'exception d'une séquence putative à doigt de zinc entre les acides aminés 590 et 625 (ZF). La protéine Hairless se localise dans le noyau, grâce à une séquence signal de localisation nucléaire bipartite (NLS, *nuclear localization signal*), située entre les acides aminés 409 et 427. Des domaines d'interaction avec des récepteurs nucléaires d'hormones ont été identifiés dans la protéine Hairless de rat qui présente 95 % d'identité avec celle de la souris : les domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires de l'hormone thyroïdienne (TR) sont situés entre les acides aminés 750 et 864 (TR-ID1) et les acides aminés 980 et 1 084 (TR-ID2) ; la région située entre les acides aminés 750 et 864 comprend également le domaine d'interaction avec le récepteur de la vitamine D (VDR-ID), ainsi que les motifs LXXLL capables d'interagir avec le récepteur α -orphelin des rétinoïdes (ROR α -ID). La protéine Hairless serait un corépresseur ; des analyses fonctionnelles ont révélé l'existence de trois domaines de répression, RD1, RD2, RD3, situés entre les acides aminés 236 et 450, 750 et 864, et 864 et 980, respectivement. La protéine HR est également capable de réguler la voie Wnt en réprimant le gène *Wise*, un inhibiteur de la voie Wnt.

450, 750 et 864, et 864 et 980, respectivement. Cette activité endogène de répression est probablement assurée par l'intermédiaire de facteurs de remodelage de la chromatine : en effet, HR semble être associée de façon sélective à un sous-groupe d'enzymes de remodelage de la chromatine, les histone désacétylases (HDAC) 1, 3 et 5, capables d'imposer une répression de l'activité transcriptionnelle aux éléments régulateurs des gènes cibles [30]. Cela suggère que HR fait partie d'un immense complexe multiprotéique régulant la répression de la transcription, la spécificité cellulaire et tissulaire étant conférée par le choix de partenaires fonctionnels. Cette interprétation se complique toutefois à la lumière de résultats très récents, qui indiquent que la protéine HR normale elle-même pourrait avoir une activité d'histone désacétylase.

Hairless et Hox

Des résultats récents obtenus à partir du croisement de mutants *hairless* avec des souris transgéniques suggèrent l'existence d'une relation, directe ou indirecte, entre la protéine Hairless et les membres du complexe Hox [11] : chez les mutants *bald Mill Hill*, l'expression du marqueur transgénique *Hoxb4/LacZ* au niveau des placodes épidermiques est en effet absente, ou confinée à quelques cellules seulement (Figure 4). Ces données indiquent que le gène *hairless* pourrait être spécifiquement impliqué dans l'organisation de la placode du follicule pileux, dès les premiers stades de son expression au niveau de l'embryon en développement. Il est possible d'imaginer que la morphogenèse normale du follicule pileux et sa polarité antéro-postérieure ou proximo-distale, qui dépendent du code Hox régional, soit également sous la dépendance de facteurs ou cofacteurs

intervenant au niveau de chaque structure embryonnaire.

De plus, la surexpression de la protéine HOXB4 dans des cultures primaires de cellules au stade nouveau-né affecte spécifiquement la prolifération des kératinocytes, et altère l'expression des molécules d'adhésion présentes à leur surface [31].

Hairless, cellules souches et voie Wnt

Le rôle fonctionnel de Hairless se situe bien dans le contexte de la différenciation des cellules épithéliales. En effet, la régénération continue de l'épiderme et le renouvellement cyclique du follicule pileux dépendent de cellules souches épithéliales localisées dans des niches spécialisées de la gaine externe [32] ; ces cellules souches sont à l'origine de précurseurs multipotents, qui migrent dans les deux sens pour peupler l'épiderme et régénérer les follicules pileux [33], et dont la différenciation dépend de signaux moléculaires sécrétés, comme SHH (*sonic-hedgehog*), BMP (*bone morphoprotein*) ou WNT (*wingless homolog*).

De très récents travaux illustrent le lien entre la destinée des cellules souches et le phénotype mutant, et établissent une association fonctionnelle entre Hairless et la voie Wnt. L'invalidation du gène *hairless* par recombinaison homologue suggère que l'intégrité de la protéine est nécessaire pour le déroulement correct de la migration des cellules souches, comme cela a été confirmé par le comportement de marqueurs de la différenciation et par l'analyse du transcriptome des kératinocytes des souris invalidées [34]. En ciblant l'expression de la protéine HR de type sauvage dans les précurseurs des kératinocytes, il est possible de corriger le phénotype *hairless* et de rétablir de façon durable et définitive le cycle du poil chez des individus *hr^{-/-}*. Cette étude par sauvetage transgénique a, par ailleurs, permis de constater que HR contrôle la signalisation Wnt en réprimant le gène *Wise*, un inhibiteur bien connu de la voie Wnt [35].

Le gène *hairless* serait donc responsable de la coordination de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la signalisation et la migration des cellules souches, pour réguler dans le temps et dans l'espace la formation, la différenciation et le cycle du poil.

Conclusions

L'intérêt d'étudier la mutation *hairless* et ses interactions avec les membres des grandes familles géniques impliquées dans le développement est double. Il est d'une part fondamental, parce que le poil permet d'étudier simultanément plusieurs processus mis en œuvre au cours de la formation d'un grand nombre de tissus : parmi ces processus figurent les interactions épithélio-mésenchymateuses, le cycle du poil, ainsi que la localisation et le maintien de la pluripotence des cellules souches. D'autre part, une meilleure connaissance des acteurs de la morphogenèse et de la physiologie de la peau apporterait de nombreux espoirs d'application des thérapies cellulaires dans le traitement des alopecies et des anomalies de différenciation des cellules de la couche basale de l'épiderme et du follicule pileux. ♦

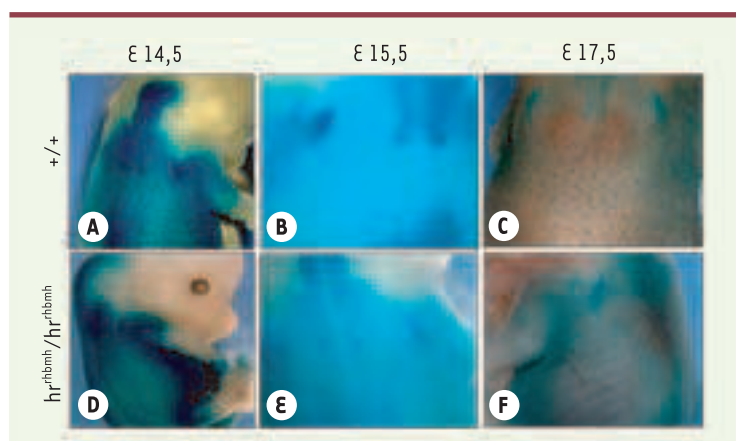


Figure 4. Profil d'expression du transgène *Hoxb4/LacZ* au cours de l'embryogenèse.

A, B, C. Chez des embryons de type sauvage, le marqueur est fortement exprimé dans les placodes du follicule pileux (A : E14,5 ; B : E15,5 et C : E17,5). **D, E, F.** On note une disparition de l'expression du transgène chez les mutants *hairless* aux mêmes stades de développement embryonnaire

SUMMARY

The mouse *hairless* gene: its function in hair root and at the heart of a subtle pleiotropy

The *hairless* gene in mammals encodes a nuclear factor that is highly expressed in skin and appears to control hair follicle integrity and cycling. In the absence of a normal and functional Hairless (Hr) protein, the hair bulb undergoes premature apoptosis during the first catagen stage of the hair cycle. The most striking effects of the mutation are loss of hair follicles and formation of epidermal utricles and dermal cysts. The *hairless* gene expression appears to be widespread and temporally regulated. The gene is strongly expressed in different compartments of the brain. *Hairless* mRNAs were detected in cartilage, gonads, thymus and colon. In addition to alopecia, hairless mice strains show subtle defects in the development and differentiation of various tissues and organs. The Hr protein is localised in cell nuclei and functions as a transcriptional regulator. Although its role has not been resolved in molecular terms, it was demonstrated that Hr is able to interact with multiple nuclear hormone receptors. Hr seems to be a part of a large multiprotein complex capable to repress transcription by its association to chromatin remodelling factors such as histone deacetylases. Recent experimental data suggest that Hr might be involved in *Hox* gene regulation, cell adhesion modulation and progenitor cells identity. At least in the skin, but probably in other organs, the Hr repressor seems to be responsible for the timing of epithelial cells differentiation. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Inserm, la Région Rhône-Alpes et le Ministère de la Recherche pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

1. Sundberg JP, Price VH, King LE Jr. The "hairless" gene in mouse and man. *Arch Dermatol* 1999 ; 135 : 718-20.
2. Kitazawa M, Ishitsuka Y, Kobayashi M, et al. Protective effects of an antioxidant derived from serine and vitamin B6 on skin photoaging in hairless mice. *Photochem Photobiol* 2005 ; 81 : 970-4.
3. Panteleyev AA, Paus R, Ahmad W, et al. Molecular and functional aspects of the hairless (*hr*) gene in laboratory rodents and humans. *Exp Dermatol* 1998 ; 7 : 249-67.
4. Dainichi T, Amano S, Matsunaga Y, et al. Chemical peeling by SA-PEG remodels photo-damaged skin : suppressing p53 expression and normalizing keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2006 ; 126 : 416-21.
5. Ahmad W, Faiyaz ul Haque M, Brancolini V, et al. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* 1998 ; 279 : 720-4.
6. Cichon S, Anker M, Vogt IR, et al. Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia. *Hum Mol Genet* 1998 ; 7 : 1671-9.
7. Cachon-Gonzalez MB, Fenner S, Coffin JM, et al. Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7717-21.
8. Stoye JP, Fenner S, Greenoak GE, et al. Role of endogenous retroviruses as mutagens : the hairless mutation of mice. *Cell* 1988 ; 54 : 383-91.
9. Panteleyev AA, Ahmad W, Malashenko AM, et al. Molecular basis for the rhino Yurlovo (*hr[rhY]*) phenotype : severe skin abnormalities and female reproductive defects associated with an insertion in the hairless gene. *Exp Dermatol* 1998 ; 7 : 281-8.
10. Jones JM, Elder JT, Simin K, et al. Insertional mutation of the hairless locus on mouse chromosome 14. *Mamm Genome* 1993 ; 4 : 639-43.
11. Brancz MV, Iratni R, Morrison A, et al. A new allele of the mouse hairless gene interferes with *Hox/LacZ* transgene regulation in hair follicle primordia. *Exp Mol Pathol* 2004 ; 76 : 173-81.
12. Zhang J, Fang S, Wang CY. A novel nonsense mutation and polymorphisms in mouse hairless gene. *J Invest Dermatol* 2005 ; 124 : 1200-5.
13. Ahmad W, Panteleyev AA, Henson-Apollonio V, et al. Molecular basis of a novel rhino (*hr(rhChr)*) phenotype : a nonsense mutation in the mouse hairless gene. *Exp Dermatol* 1998 ; 7 : 298-301.
14. Ahmad W, Panteleyev AA, Sundberg JP, Christiano AM. Molecular basis for the rhino (*hrh-8J*) phenotype : a nonsense mutation in the mouse hairless gene. *Genomics* 1998 ; 53 : 383-6.
15. Bernard BA. Hairless and genetic disorders of hair. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 276-80.
16. Indelman M, Bergman R, Lestringant GG, et al. Compound heterozygosity for mutations in the hairless gene causes atrichia with papular lesions. *Br J Dermatol* 2003 ; 148 : 553-7.
17. Cachon-Gonzalez MB, San-Jose I, Cano A, et al. The hairless gene of the mouse : relationship of phenotypic effects with expression profile and genotype. *Dev Dyn* 1999 ; 216 : 113-26.
18. Panteleyev AA, Paus R, Christiano AM. Patterns of hairless (*hr*) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 2000 ; 157 : 1071-9.
19. Klein I, Bergman R, Indelman M, Sprecher E. A newborn presenting with congenital blistering. *Int J Dermatol* 2004 ; 43 : 295-7.
20. Klein I, Bergman R, Indelman M, Sprecher E. A novel missense mutation affecting the human hairless thyroid receptor interacting domain 2 causes congenital atrichia. *J Invest Dermatol* 2002 ; 119 : 920-2.
21. Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2003 ; 8 : 46-55.
22. San Jose I, Garcia-Suarez O, Hannestad J, et al. The thymus of the hairless rhino-j (*hr/rh-j*) mice. *J Anat* 2001 ; 198 : 399-406.
23. Sundberg J. The hairless (*hr*) and rhino (*hr rh*) mutations, chromosome 14. In : Sundberg J, ed. *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities*. Boca Raton : CRC Press, 1994 : 291-312.
24. Garcia-Atares N, San Jose I, Cabo R, et al. Changes in the cerebellar cortex of hairless Rhin-J mice (*hr-rh-j*). *Neurosci Lett* 1998 ; 256 : 13-6.
25. Djabali K, Aita VM, Christiano AM. Hairless is translocated to the nucleus via a novel bipartite nuclear localization signal and is associated with the nuclear matrix. *J Cell Sci* 2001 ; 114 : 367-76.
26. Potter GB, Beaudoin GM 3rd, DeRenzo CL, et al. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 2687-701.
27. Moraitis AN, Giguere V, Thompson CC. Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 6831-41.
28. Moraitis AN, Giguere V. The co-repressor hairless protects RORalpha orphan nuclear receptor from proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 52511-8.
29. Hsieh JC, Sisk JM, Jurutka PW, et al. Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 38665-74.
30. Potter GB, Zarach JM, Sisk JM, Thompson CC. The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol* 2002 ; 16 : 2547-60.
31. Komuves LG, Michael E, Arbeit JM, et al. HOXB4 homeodomain protein is expressed in developing epidermis and skin disorders and modulates keratinocyte proliferation. *Dev Dyn* 2002 ; 224 : 58-68.
32. Braun KM, Niemann C, Jensen UB, et al. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment : visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 2003 ; 130 : 5241-55.
33. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000 ; 102 : 451-61.
34. Zarach JM, Beaudoin GM 3rd, Coulombe PA, Thompson CC. The co-repressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin. *Development* 2004 ; 131 : 4189-200.
35. Beaudoin GM 3rd, Sisk JM, Coulombe PA, Thompson CC. Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 14653-8.

TIRÉS À PART

S. Nonchev

BUT DE THÈSE

But des travaux de thèse

Les dernières années ont été particulièrement dynamiques concernant les recherches sur le gène, la protéine et les mutants *hairless*. L'étude de cette mutation représente un intérêt certain pour la recherche fondamentale, comme pour la recherche appliquée. Décrypter les voies de signalisation impliquant la protéine *Hairless* et comprendre la façon dont le gène est régulé, permettraient de concevoir des applications possibles pour le traitement de pathologies cutanées. Actuellement un grand nombre de questions posées sur ce gène ne sont pas élucidées. Comment est régulée l'expression de *Hr* dans les différents tissus et organes ? Quel est son rôle précis dans la morphogenèse du follicule pileux et la peau ? Quels sont les gènes cibles de l'action d'*Hairless* ?

Comme il a été souligné dans l'Introduction, les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire avaient permis de détecter les altérations du locus *hairless* chez les mutants *bald Mill Hill*. Une protéine mutante *HR bmh*, à localisation subcellulaire anormale, a ainsi été identifiée. Pour comprendre la signification de ces deux découvertes majeures, il nous manquait des éléments-clés. D'une part aucune donnée concrète n'avait été communiquée quant aux mécanismes moléculaires précis de régulation du gène *Hr* de type sauvage. D'autre part, le fait de retrouver ce corépresseur de récepteurs nucléaires d'hormones dans le cytoplasme nous mettait dans une situation tout à fait originale et demandait l'étude de la localisation précise ainsi que l'identification des partenaires subcellulaires potentiels de cette protéine mutante.

J'ai développé ce projet selon deux axes principaux. J'ai voulu élargir l'étude de la structure et de la fonction du locus *hairless* de la souris. Je me suis donc attaqué aux éléments régulateurs responsables de la spécificité de l'expression de *Hr* et des interactions avec les récepteurs nucléaires d'hormones. Mon objectif principal dans cette partie du projet a donc été de comprendre et d'analyser finement la régulation du gène *hairless* chez la souris grâce à l'étude de son promoteur. Je me suis concentré sur une région de 3 kb en amont du gène *Hr* dont j'ai fait l'analyse détaillée par délétions en culture cellulaire. J'ai finalement essayé d'identifier des motifs consensus de fixation de VDR et TR et tester leur fonctionnalité par une série d'approches de biologie moléculaire et cellulaire.

Dans le deuxième volet du projet de thèse, l'analyse de la signification fonctionnelle de la localisation cytoplasmique de la protéine *HR bmh* a été abordée en profondeur. J'ai étudié la répartition de cette protéine mutante dans différents compartiments du cytoplasme et j'ai développé une série d'approches

de pointe pour identifier ses partenaires. Mon travail a alors consisté à comprendre si la protéine HR b^{mh}, qui restait localisée dans le cytoplasme cellulaire, s'associait à des protéines cytosoliques ou empruntait les voies des ultra-structures membranaires. Selon les résultats obtenus, je déterminerais si la protéine HR b^{mh} peut être détectée et éliminée comme un produit aberrant par une voie de dégradation spécifique, ou au contraire, si elle a une fonction d'interaction avec les compartiments cytoplasmiques grâce aux propriétés de ses motifs connus ou non encore identifiés. Les réponses à toutes ces questions nous permettraient de proposer une explication pour le phénotype alopécique chez les souris hairless bald Mill Hill.

RÉSULTATS

Chapitre 2

Résultats

2.1 Publication n° 1

2.1.1 Identification d'éléments régulateurs en amont du gène *hairless* de la souris

La première partie de ce travail est centrée sur l'étude de la région promotrice du gène *hairless* et notamment sur la mise en évidence d'éléments régulateurs qui pourraient contrôler divers aspects de son activité. A l'heure actuelle, la région promotrice du gène *Hr* est très mal explorée. Chez le rat, une séquence contenant des éléments de réponse à l'hormone thyroïdienne (TRE) a été retrouvée à 9 kb en amont du gène. Il a été montré que ce motif pouvait contrôler spécifiquement l'expression de gènes rapporteurs en condition de transfection transitoire. Des séquences contenant des TREs ont également été répertoriées chez l'homme. Il a été suggéré que ces éléments n'étaient fonctionnels que dans des lignées cellulaires d'origine neurale et incapables d'activer la transcription dans des kératinocytes. Ce premier article rend compte du travail que j'ai effectué pour décrypter la régulation du promoteur du gène *hairless* chez la souris.

2.1.1.1 Le site d'initiation de la transcription du gène

La première étape du projet a permis de situer précisément le site d'initiation de la transcription, nécessaire pour pouvoir isoler, ultérieurement, le promoteur du gène. Des expériences de Northern blot ont permis de localiser ce site à environ 4000 pb en amont de l'ATG du gène *Hr*. Pour ces expériences des extraits d'ARN totaux de différents tissus de souris et lignées cellulaires ont été utilisés. Les données obtenues, à partir des Northern blot, sur la taille de l'ADNc du gène *hairless* chez la souris ont dirigé le choix d'amorces spécifiques pour le côté 5' de ce fragment. Par des réactions d'extensions d'amorce de plus en plus précises, accompagnées de séquençages manuels, j'ai identifié la séquence du site d'initiation de la transcription et ce fut le point de départ pour essayer de cerner et disséquer la région promotrice.

2.1.1.2 Le promoteur essentiel du gène *hairless*

Différentes constructions de séquences nucléotidiques en amont du site d'initiation de la transcription ont été générées afin d'isoler le promoteur du gène. Ces séquences ont été clonées dans des vecteurs d'expression couplées à la luciférase. Puis par des expériences de transfections transitoires dans différentes lignées cellulaires j'ai pu isoler la construction contenant la séquence minimum et essentielle (appelé RE1 - regulatory element 1) pour l'activation du gène de la luciférase. Les deux lignées cellulaires utilisées sont les cellules NIH 3T3, des fibroblastes de peau, et les cellules GHFT1, des cellules issues de la glande pituitaire de souris. Ces deux lignées ont été choisies pour appréhender l'expression de Hr dans un contexte cellulaire spécifique. En effet, ce gène est fortement exprimé dans la peau, le follicule pileux et le cerveau, même si le phénotype mutant concerne exclusivement le tégument et les annexes cutanés.

L'étape suivante a été d'analyser *in silico* ces séquences afin de trouver des motifs qui seraient de bons candidats pour des sites de fixation de facteurs en amont du gène et capables de contrôler son expression. Grâce aux bases de données et logiciels présents sur le site Genomatix j'ai pu isoler une dizaine de sites putatifs pouvant avoir une action sur la régulation des régions promotrices. Parmi ceux-ci trois sites principaux, situés dans la partie minimum RE1, ont été retenus : deux sites putatifs de fixation du récepteur de la vitamine D (VDR) et un site de fixation du récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 (TR). Ces sites ont été tout d'abord testés par des expériences de retard sur gel. Après avoir co-transfecté TR et VDR dans des cellules NIH 3T3, des shifts dans la migration des nucléotides contenant les TRE et VDRE présomptifs ont été observés. Cette formation de complexes est en faveur d'une interaction physique entre les sites putatifs et les récepteurs. Les tests fonctionnels ont été réalisés par plusieurs approches. La transfection transitoire de la construction contenant le RE1 couplé à la luciférase avec les constructions TR/RXR ou VDR/RXR, dans les différentes lignées cellulaires, ont montré une augmentation de l'activité du promoteur par rapport à celle sans récepteur nucléaire. Enfin un traitement d'hormone thyroïdienne T3 ou de vitamine D3 augmente et module également cette activité. Cet effet est spécifique et dépend du type cellulaire (T3 dans le cas des GHFT1 et D3 dans le cas des NIH 3T3).

Afin de mieux élucider la régulation par les protéines TR et VDR, une analyse par délétions a été entamée en supprimant successivement les différents motifs présents sur la séquence RE1 afin de voir lequel ou lesquels étaient vraiment essentiels pour l'activité promotrice du gène *hairless*. De manière intéressante, les 60 premières paires de base de RE1 (que nous avons alors appelés UE60) avaient un rôle essentiel à jouer dans la régulation de ce promoteur. En effet, lorsque ces 60 pb sont supprimées, le promoteur perd jusqu'à la moitié de son activité, laissant présager un rôle fonctionnel de ces 60 nucléotides. Enfin j'ai pu constater que l'élément VDRE, bien qu'important pour l'activation du promoteur dans des lignées fibroblastiques de peau, n'était pas essentiel à la régulation de RE1, sa suppression n'entraînant aucune diminution de l'activité du promoteur. Par contre, l'élément TRE semble extrêmement important

pour l'activation du promoteur, puisque sa suppression (conjointement à celle de l'UE60) entraîne l'annulation quasi-complète de l'activité du promoteur, celle-ci étant alors identique au vecteur rapporteur vide.

Enfin une série de transfection dans des cellules NIH 3T3 et GHFT1 en présence ou absence de récepteurs nucléaires et avec ou sans traitement hormonaux (voir papier) ont montré que le TRE de la séquence RE1 était son élément essentiel. Ce motif est important dans les cellules NIH 3T3, mais semble plus opérationnel en cellules d'origine neurale. Les VDREs modulent aussi l'activité transcriptionnelle en fonction du contexte cellulaire.

Article en soumission

L'ensemble de ce travail est actuellement en soumission. Il est présenté sur les pages qui suivent. J'ai réalisé personnellement les expériences décrites dans cet article. J'ai également participé à la conception et à la réalisation du manuscrit.

Functional mapping of the mouse *hairless* gene promoter region

Eric G. Folco¹, Rabah Iratni¹ and Stefan Nonchev^{1*}

¹Institut Albert Bonniot, INSERM U823, University Joseph Fourier, Grenoble 1,
Site – Santé, 38042, Grenoble, Cedex 6, France

*correspondence to

Stefan Nonchev

Institut Albert Bonniot, INSERM U823, University Joseph Fourier, Grenoble I,
Site – Santé, 38042, Grenoble, Cedex 6, France

tel : 33 476 54 95 75 ; fax : 33 476 54 95 95

email : snonchev@ujf-grenoble.fr

key words : *hairless* gene, cis-regulation, hormone receptor, promoter, DNA
binding

Abstract

The mouse *hairless* gene (*Hr*) encodes a protein of 127 kDa, acting as corepressor of nuclear hormone receptors. The Hairless protein (HR) is involved in the control of the cellular transition to the first hair cycle in adult Mammals. In its absence hair follicles disintegrate leading to a complete and irreversible hair loss with formation of cutaneous cysts. The hairless phenotype is therefore linked to defective proliferation and migration of the hair follicle stem cells apparently unable to respond to various signalling molecules. The *Hr* gene is expressed at high levels in skin and brain, and *hairless* transcripts were detected in gonads, thymus and colon. Although the patterns of *Hr* expression appear to be spatially and temporally regulated, very little is known about the molecular basis of the transcriptional control underlying *Hr* gene function. In this work we determine the precise transcriptional initiation start site of the mouse *Hr* gene and identify a new 1,1 kb cis-control element (RE1) that encompasses the promoter region and is able to drive luciferase reporter expression in skin and brain derived cell lines. We performed a deletion analysis and explored functionally regulatory motifs within this fragment to show that the role of this upstream regulatory region is linked to the presence of TRE and VDRE binding sites. We find that a TRE situated at –300 bp from the cap site is essential for gene expression in both skin NIH 3T3 and GHFT1 cells, while a VDRE positioned 94 bp upstream of the TRE modulates reporter expression specifically in skin derived cell lines. In addition, we define a novel cis-regulatory motif UE60, situated at the 5'-end of RE1 and likely to interact with both TRE and VDRE. Our data complete previous results on the possible existence of an autoregulatory pathway, implicated in *Hr* gene regulation. Taken together these findings reveal a complex molecular network that potentially links several signalling pathways in hair follicle formation. We discuss the organisation of the regulatory modules in the mouse *Hr* gene upstream DNA sequences in the light of the high homology of this region in mouse, rat and human.

Introduction

In Mammals the hair follicle cycle is controlled by a complex network of genetic interactions where the hairless (*Hr*) gene plays a crucial role to maintain stem cell mediated hair growth and regression. The structure and expression of *Hr* was thoroughly analysed in mouse, rat and human [1], [2], [3], [4]. It was established that the Hairless protein (HR) is a nuclear receptor corepressor able to regulate gene transcription by its direct association to VDR, TR, ROR, as well as by its involvement in the control of Wnt signalling pathway and *Hox* gene expression [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11] [12]. The *Hr* and *Vdr* genes are coexpressed in cells of the hair follicle, their mutations in mice and human share a common skin phenotype and their protein products interact physically in a way that this association drastically represses VDR mediated transactivation [8], [13], [14], [15]. The *Hr* gene is regulated by the thyroid hormone, the Hairless protein binds to TR *in vivo* and, at least in the brain, HR represses the transcription of TH-responsive genes by recruiting a particular complement of HDAC activities [16], [7]. Surprisingly, the majority of these elegant studies did not provide enough details on the *Hr* gene regulation itself, leaving open the question of a possible autoregulatory pathway that would function in various physiological contexts.

In the rat a TR/RXR binding site was mapped within a 106 bp fragment, 9 kb upstream of the first exon. A 23 bp sequence including an imperfect direct repeat of the type DR+4 was shown to act as a TRE [5]. A sequence matching a type DR+4 TRE was found at 2,6 kb upstream of the mRNA cap site in the human hairless gene and a 3 kb fragment containing this element was cloned with luciferase gene reporter and tested in absence and presence of T3 in brain and skin derived cell lines [17]. This study tackled the function of human *Hr* gene promoter fragments in specific cell types illustrating the complexity of differential transactivation mechanisms controlling gene expression in various tissue contexts. Indeed, the upstream sequences of the *Hr* gene include regulatory elements and putative transcription factor binding sites that were poorly described in rats and humans and never addressed in the mouse.

Here we report results on the fine structure of the mouse *Hr* gene promoter region. We mapped the precise *Hr* gene transcription start site and identified a one kb regulatory element (RE1) essential for promoter activity and harbouring consensus binding sites for TR and VDR. Epitope tagged VDRs and TRs were used to test the functionality of both TRE and VDRE by electrophoretic mobility shift assays (EMSA), and confirmed the ability of the putative sequences to bind specifically their transcription factors. Using a series of deletion

derivatives, we performed functional analysis in skin and brain derived cell lines in order to narrow down the minimal regulatory motifs underlying context specific activity. We show that thyroid hormone and vitamin D are both able to boost RE1 driven reporter expression in the respective cellular context. Our data suggest that the consensus TRE, which is conserved in Mammals, but is a part of differently organised regulatory modules, is absolutely essential for *Hr* gene promoter activity. We identified a new 60 bp regulatory sequence (UE60) at the far 5'-end of the RE1, able to interact with the TRE and control a correct physiological response to hormone treatment. The role of the two VDREs identified appears to be much more subtle and suggest that these regulatory motifs contribute to the specific modulation of the promoter activity in skin derived fibroblasts. Taken together our data allow to identify new DNA control sequences in the promoter of the mouse *Hr* gene and shed more light on the molecular mechanisms of a putative autoregulatory pathway underlying its tissue specific transcription.

Results:

Initiation start site of the hairless RNA transcription

Although the *Hr* gene structure and expression in mouse, rat and human have been thoroughly analysed in a number of laboratories, quite surprisingly, the gene transcription start site and the fine structure and properties of the immediate promoter region have not been clearly determined. Therefore we firstly set out to generate northern blots from various tissues and cell lines and hybridise them with a 1172 bp fragment probe generated by XbaI/HindIII digestion of mouse *Hr* cDNA cloned in pSK based vector. We detected a major transcript of 7,5 kb in skin, brain and heart RNA. No expression was found in the liver (Figure 1A). In addition to the organs, RNAs were extracted from a number of cultured cell lines. It is noteworthy that only the GHFT1 cells originating from the pituitary gland were expressing the *hairless* gene. Probing RNA from HaCat cells produced one weak and apparently non-specific band of about 5 kb, while no fragments were seen on the blots of the other cell lines (HaCat, HEK293, Cos, NIH 3T3 and HeLa) used (Figure 1A and not shown). As the length of the cDNA of the mouse *hairless* gene was confidently determined to be of about 4017 bp [1], we estimated that the precise site of initiating of RNA synthesis should be positioned at 4000 bp upstream of the ATG in the second exon of the mouse *hairless* gene. We then performed a primer extension analysis on total RNAs from several mouse organs at different developmental stages, as well as from various cultured cell lines in order to identify the *hairless* gene transcription start site. Using an end-labelled nucleotide of 25 bp (see Figure 2 and Material and Methods) designed to be complementary to a most 5'-end of the putative transcript, we produced in all the samples analysed a clear single stranded cDNA fragment of 645-660 nucleotides which allowed us to define more precisely the 5'-end of the transcript (Figure 1B). In order to elucidate ultimately the position and identity this promoter sequence, we designed another primer extension assay and obtained in skin and brain a band of 169 bp allowing to define precisely the sequence where the cap site is positioned. A manual sequencing reaction was then run along this second primer extension experiment in order to help determining the exact base pair and confirm the identity of the initiating guanine nucleotide (Figure, 1c). These combined mapping approaches allowed therefore to define for the first time the precise promoter domain of the mouse *hairless* gene and enabled us to start deciphering specific regulatory elements in the immediate upstream sequences in and around the promoter region (Figure 2).

Identification of DNA sequences essential for the Hr gene promoter activity in cultured cell lines

To test the regulatory potential of the region, we cloned a large 3 kb fragment encompassing the *Hr* gene promoter in a vector coupled to the luciferase reporter. Based on the fact that *Hr* is expressed strongly in skin and brain, we explored the ability of this big fragment to drive basal reporter expression in two different types of cell lines as models of transcription activity in fibroblasts (NIH 3T3) and pituitary gland (GHFT1). We then created a series of deletion derivatives and identified elements absolutely essential for basal transcription. As illustrated on Figure 3, construct 1 representing the whole 3 kb fragment (Figure 3A) contains elements able to promote high levels of reporter expression in both cell lines. Note that the levels of this activity are comparable in NIH 3T3 and GHFT1 cells (Figure 3B, 1). When this fragment was divided in two elements of roughly equal size we found out that construct 2 (nt -2388 to nt -769) was unable to drive reporter expression, while construct 3 (nt -837 to nt +461, Figure 3A) insured robust reporter activity of comparable levels in fibroblasts and neural cells (Figure 3B, 2 and 3). To monitor the efficiency of the border sequences of constructs 2 and 3, we generated constructs 4 (nt -2388 to nt -491) and 5 (nt -553 to nt +461). Here again, we established that this 1,1 kb long 3' part of the whole fragment (construct 5) potentiated extremely high levels of luciferase expression especially as far as NIH 3T3 cells are concerned (Figure 3B, 5). In the same time, the whole 2,0 kb 5'- sequence (construct 4) was not efficient to govern reporter function neither in skin nor in brain derived cells (Figure 3B, 4). With constructs 6 (nt -837 to nt -491) and 7 (nt -1747 to nt -769, Figure 3A) we tested the role of short sequences adjacent to the 5'-end of the essential promoter element to find out that they were efficient in none of the cell lines (Figure 3B, 6 and 7). With construct 8 (nt -2388 to nt -1575, Figure 3A) the effect of sequences remote to the promoter core was addressed and as it can be seen on Figure 3B, 8, this sequence is also unable to guarantee luciferase activity in the tested cell populations.

Taken together the data of this deletion analysis suggest that the regulatory elements responsible to govern the *Hr* gene basal promoter activity are organised within a 1kb fragment we named RE1 for regulatory element number 1, encompassing the transcription start site and its immediately adjacent upstream and downstream sequences. As shown on Figure 2 and as previously stressed, careful examination of this sequence allows to spot a number of potential upstream factors binding sites. Among those we got particularly interested in the strong consensus response elements – one for the transcription factor thyroid hormone receptor

(TRE, nt -300 to nt -279) and two for the vitamin D receptor (VDRE1, nt -395 to nt -371 and VDRE2, nt -27 to nt -3, Figure 2). Despite the fact that direct protein – protein interaction of HR with TR and VDR was substantially described and thoroughly analysed [5], [8], very little is known about the possibility of a regulatory loop in which TR and/or VDR would regulate the *Hr* gene transcriptional activity in various cellular contexts [17].

The TRE and VDRE within RE1 form specific complexes when incubated with extracts from TR and VDR transfected cells.

Having delineated the 1,1 kb essential promoter region RE1, we pursued gel retardation experiments in order to test the capacity of the RE1 located VDRE and TRE to form complexes with VDR and TR from whole cell extracts. The electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using double stranded radio-labelled nucleotides incubated with protein extracts from NIH 3T3 cells transfected with Flag tagged VDR and TR α 2 are illustrated on figure 4A. As illustrated by Figure 4A, lane 1, the first radio-labelled sequence (nt -527 to nt -409) did not display any migration shift. In fact this motif does not contain putative TRE or VDRE binding sites. The second probe (nt -527 to nt -321) contained the nucleotide sequence of the lane 1 plus the first putative VDRE sequence (nt -395 to nt -371). As shown on Figure 4A, lane 2, a substantial retardation is noted with this fragment. The third oligonucleotide (nt -527 to nt -260) encompassing both sequences 1 and 2 contains an additional fragment of 61 bp, harbouring the putative TRE binding site. Therefore, specific complexes 1 and 2 leading to the observed gels shifts were formed with both TRE and VDRE fragments (Figure 4A, lanes 2 and 3). Treatment of the transfected NIH 3T3 cells with vitamin D3 (lanes 4 to 6) or with thyroid hormone T3 (lanes 7 to 9), did not affect complex formation and gel shift patterns after migration. The components of these complexes are now being analysed in super-shift experiments using a panel of antibodies to probe the specificity and the stability of the complexes formed.

Effects of Vitamin D and thyroid hormone on RE1 activity

To confirm the functional role of the newly identified regulatory motifs within the RE1 we designed cotransfection experiments in the cell lines that reflect promoter activity in skin and brain. NIH 3T3 and GHFT1 cells were then cotransfected with luciferase coupled RE1 together with either VDR/RXR or TR/RXR expression vectors. As expected, both vitamin D and the hormone T3 boosted basal reporter activity even in the absence of receptor

coexpression in NIH 3T3 and in GHFT1 cell lines (Figure 4B and C). However, when VDR and TR were present in the transfected cells a robust increase of reporter expression was observed only when NIH 3T3 cells were treated with Vitamin D (Figure 4B, Compare Co2 and Co3). In contrast, when cotransfection and ligand treatment were performed in GHFT1 cells, only the TR, but not the VDR, responded to ligand treatment by a massive increase of luciferase gene transcription (Figure 4C, Compare Co3 to transfections Co1 and Co2). Co-expression of VDR and RE1 had no effect on reporter activity that remained at similar levels with or without ligand treatment (Figure 4C - transfections Co1 and Co2). These data clearly suggest that despite the presence of both VDRE and TRE, the RE1 element could behave specifically in different cellular contexts. In particular, in brain derived cells it is sensible to thyroid hormone, but not to the vitamin D. This finding sheds more light on the molecular basis of this regulatory interaction and confirms previous observations that in developing brain, but not in the skin, the *Hr* gene is controlled by the TR.

Deletion analysis of RE1 function

The next important question we addressed was the regulatory potential of the consensus VDRE and TRE and their interaction with other elements within RE1. We wanted to define even better the minimal motifs mediating specific ligands responses in NIH 3T3 and GHFT1 cell lines. To test this we generated a series of luciferase reporter coupled deletion derivatives from RE1 and explored their activity separately in NIH 3T3 cells and GHFT1 cells with and without respective ligand treatment. Surprisingly, in NIH 3T3 as well as in GHFT1 cells, deletion of the first 60 nt (Construct A, nt -504 to nt +461) reduced substantially the levels of reporter expression (Figure 5A, construct A and Figure 5B and C). Although the overall transcription activity remained robust (compared to luciferase reporter alone – the pGL3basic plasmid, construct G) in both lines, this sharp reduction in luciferase expression was in favour of an even more complex regulatory mechanisms governing the RE1 function and involving its most upstream nucleotides. We called this 5' element UE60 (for upstream element of 60 nucleotides), examined the sequence for candidate transcription factor binding sites and pursued the exploration of its functionality in cotransfection experiments (see Figure 6A and B). Narrowing down the construct A by about one hundred bp, we obtained construct B - nt-423 to nt +461. This element encompasses the TRE as well as the two VDRE sequences (Figure 5A). The transient transfection of construct B in NIH 3T3 and GHFT1 cells did not modify luciferase transcription levels in the presence or absence of vitamin D and T3

respectively (Figure 5 b and c, construct B). A major observation in this analysis was the fact that deletion of VDRE1 (construct C, nt -368 to nt +461) did not affect at all the regulatory function of RE1 neither in NIH 3T3, nor in GHFT1 cells (Figure 5B and C construct C). In contrast, when the TRE was removed (construct D), a sharp loss of luciferase activity was recorded in both cell types (Figure 5B and C, construct D). The TRE seems therefore to be an essential part of RE1 and its function is not influenced by the cellular environment. In the same time the ligand treatment data suggest that thyroid hormone is efficiently boosting reporter expression of all constructs containing the TRE motif and does not affect reporter activity when this sequence is removed (Figure 5B and C – compare A,B and C to D, E, and F). Finally, with constructs D, E and F we observed a highly reduced reporter expression comparable to the one driven by the basic control luciferase plasmid pGL3basic in both transfected cell lines (Figure 5B and C – D, E, F). This result indicates that VDRE2, which is situated very near to the cap site has not the potential to activate transcription in these experimental conditions. To complete and refine this analysis we designed experiments with the element RE1 and two selected key constructs (constructs A and D from Figure 5A), mediating sharp changes in transcriptional activity and used them in cotransfection studies with TR/RXR dimmers and thyroid hormone treatment. It was not surprising to see that in NIH 3T3 cells, cotransfection of the TR/RXR with elements containing the TRE sequences (constructs RE1 and A) accompanied by T3 administration leads to levels of luciferase expression that were higher than those obtained without ligand treatment Figure 6A, Co1 and Co2). It was interesting to observe in this cell type that TR cotransfected RE1 responded much more vigorously to T3 than its deletion derivative construct A (Figure 6A, Co1 and Co2). This particular result confirms the importance of the 60 bp upstream motif previously identified. In addition, removing the TRE (construct D) abolished this difference and the overall levels of expression fell to a minimum activity with and without thyroid hormone T3 (Figure 6A, Co3). Intriguingly, in GHFT1 cells the same type of cotransfection and ligand treatment restored the loss of reporter activity observed with construct A, compared to RE1 (Figure 6B, Co1 and Co2). The effect of the T3 is there but both RE1 and construct A displays the same regulatory potential in the presence or absence of the thyroid receptor (Figure 6B, Co1 and Co2). Once the TRE-less version is cotransfected, transcriptional activity and differences between treated and untreated cells are completely erased (Figure 6B, Co3). This group of data clearly show that independently of the type of cell line used and ligand treatments applied in the transfection experiments, the TRE motif plays a key role in RE1 function and *Hr* gene regulation.

Discussion

Although the mouse *Hr* gene is known for many years, its expression patterns have not been described until recently and its regulation remains unclear [18], [19] [20]. The upstream regions of this gene are largely unexplored and elements driving gene expression in a specific temporal and spatial manner were never identified. Indeed, prior experiments and analyses have stressed the fact that in rat and human the *Hr* gene regulation relied on upstream sequences containing proximal and distal predicted and predictable cis regulatory elements [5]. Based on the fact that the *Hr* is a thyroid hormone-responsive gene and that its protein product is a nuclear hormone receptor co-repressor, a partial analysis of its upstream regions in rat and human revealed functional TREs residing in the putative promoter.[21], [7], [17]. These data suggested that *Hr* is a target of hormone receptors signalling pathways and might be a part of an autoregulatory loop involved in the specific controls of downstream hormone responsive genes. In the present work we analysed in more detail the promoter region of the mouse *Hr* gene. Taking into account the fact that many of the known cis-regulatory modules are made of clusters of phylogenetically conserved and repeated transcription factors (TF) binding sites, we started by restricting our analysis to modules located immediately and or moderately proximal to the *Hr* gene cap site. Using Northern blots, primer extension experiments and manual sequencing, we were able to define precisely the gene transcription cap site in the mouse at 3935 bp upstream of the ATG. Although the position of the *Hr* gene cap site in human and rat was previously inferred from human and rat library screenings with subsequent sequencing [5], [4], [17], here we defined for the first time the precise cap site, which allows to ultimately anchor the first nucleotide of the mouse *Hr* gene transcript and undertake a fine mapping of its promoter activity. We then tested systematically the regulatory potential of upstream sequences by transfection of deletion derivatives linked to luciferase reporter in skin and brain derived cell lines. A one kb regulatory element (RE1) was identified harbouring a number of putative transcription factors binding sites (Figure 2). A TRE motif of the type DR+4 was found at 300 bp upstream of the cap site and two potential VDREs that were not mentioned nor analysed before were noted within the essential RE1 sequence (Figure 2 and 7). We found that the TRE is essential for promoter activity in both cells lines used. In brain derived cells, however, this TRE is much more efficient than in fibroblasts (Figure 6A and B). When it is abolished, the promoter activity is completely lost (Figure 5A, B and C). Even if the first VDRE motif identified was not absolutely essential for the RE1 activity, its presence potentiates significantly the activation of the promoter

specifically in the NIH 3T3 fibroblasts (Figure 5A, B and C). The second putative VDRE affects neither the whole RE1 activity nor that of its deletion derivatives. In contrast, the presence and the integrity of a 60 bp sequence (a fragment we call UE60) at the far 5' site of the RE1 is critical for the overall activity of the *Hr* gene promoter as well as for the levels of reporter expression in response to ligand treatments in both cell lines; The RE1 element responded strongly to both vitamin D and T3 treatments. It is important to note that the response to vitamin D is much stronger in NIH 3T3 cells, while the T3 response is more efficient in GHFT1 cells (Figure 4B and C). When the sequences upstream of the TRE are deleted, treatment with T3 is able to restore promoter activity specifically in GHFT1 cells, but not in NIH 3T3 cells (Figure 6A and B). Thus, in addition to the fact that the TRE is essential for the RE1 function in brain derived cells it interacts with the UE60 to potentiate a correct and physiological response to hormone treatment. The TREs consist typically of direct repeats sequences separated by a number of base pairs that can interact with hormone bound TR. As mentioned before, the functional TRE identified in this study is of the type DR+4 (GGGGATGTCCTCAGATGCCCTC) and is situated at 300 bp from the cap site (Figures 2 and 7). It is important to note that in the human and in rat DR+4 type of TREs were identified that varied in their repeated motifs as well as in their location with respect to the transcription start site of the *Hr* gene in these species [5], [17] and Figure 7. Like the TR, the vitamin D receptor (VDR) is a ligand-regulated transcription factor that recognizes cognate vitamin D response elements (VDREs) formed by direct or everted repeats of PuG(G/T)TCA motifs separated by 3 or 6 bp (DR3 or ER6)[22]. More than 900 vitamin D regulated genes are known in the mammalian genome and VDR binding was confirmed to several elements in vivo. VDREs lying within ≈ -10 to $\approx +5$ kb of the 5'-ends were assigned to 65% of these genes. It was established that the effect of a nucleotide substitution on VDR binding in vitro does not predict VDRE function in vivo, because substitutions that disrupted binding in vitro were found in several functional elements [22]. In our hands the comparison of the two VDREs in the RE1 element shows that the VDRE1 has a fairly good core of consensus sequence TGAAGGA, while VDRE2, situated very close to the cap site displays less homology to the functional VDR recognition sites in various promoters [23].

The existence of an autoregulatory loop, by which activation of the *Hr* gene would contribute to the repression of downstream ligand responsive genes remains an open question in skin and hair follicle biology. The data of this work do not corroborate a previously postulated TRE mediated negative autoregulation that inhibits *Hr* promoter in keratinocytes but not in neuroblastoma cells [17]. By contrast, we found that thyroid hormone could enhance reporter

expression from the RE1 in both skin and brain derived cells. Our results rather show that the T3 pathway is likely to exert its effect through of an yet unknown UE60 site binding upstream factor(s) and that VDREs modulate this interaction.

In fact, very little has been done to tackle the modular structure of the *Hr* gene regulatory sequences. In a pioneering study of Ahmad et al. 1999 a human genomic DNA sequence of 1058 bp 5' of the *Hr* gene was analysed to establish the lack of TATA consensus sequences and to find by the Signal program putative binding sites for the transcription factors GATA-1, GATA-2, SP1 and AP1 [4]. Our data complete previous results on the thyroid hormone signalling responsive elements and shed more light on a possible interplay between TRE, VDREs and UE60 regulatory modules within and outside of the RE1 element. Our genomic blasts using the MatInspector program identified putative binding sites for Lef1/TCF and retinoic acid receptors known to mediate signalling that underlie fundamental processes of skin and brain development. Comparison of the upstream sequences suggests that these sites are again organised in a different way in mouse rat and human (Figures 7). Functional exploration testing the regulatory potential of the elements encompassing crucial upstream factors binding sites are now required and we started cloning the regulatory sequences identified by this study in LacZ and GFP reporter constructs in order to generate transgenic mice and decipher the temporal and spatial control of the *Hr* gene during development.

Materials and Methods

Primer Extension:

For primer extension assays, a first antisense primer 5'-CAGGTGACCTGACCTTAGTTTGCTG-3' complementary to the sequence from nt +626 to nt +651 (see figure 2, used in figure 1B), and a second antisense primer 5'-GAGTCCTTGCAGCTGGCTGTG-3' complementary to the sequence from nt +148 to nt +169 (see figure 2, used in figure 1C) were labeled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase (NEB). Total RNA from mice tissues (skin, liver, brain, heart) and different cell lines (NIH 3T3, GHFT1, ES, P19, HEK 293, HaCaT) was prepared using TRIzol reagent protocol (Invitrogen) and RNAqueous kit (Ambion). 20 μ g of total RNA was hybridized with labeled oligonucleotide (10^5 to 10^6 cpm), qsp 50 μ L H₂O. 0,1 volume of 3M sodium acetate and 2,5 volume of cold ethanol 100% were added for 1 hour at -20°C. The samples were precipitated with ethanol and resuspended in 20 μ L of a buffer containing 40 mM PIPES (pH 6.4), 1 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl and 80% formamide. The samples were then denatured at 85°C for 10 min and let overnight à 42°C. The samples were precipitated with ethanol and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM of each dNTP, 1 mM dithiothreitol, 20 units RNasin and 15 units SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and then incubated for 2 h at 42°C. The reaction was inactivated at 70°C for 10 min. The reaction mixture was treated with RNaseA, phenol and chloroform extracted, ethanol-precipitated, and resuspended in TE buffer (10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl). The products were analyzed by resolution on an 6% polyacryamide/8M urea sequencing gel and overnight autoradiography on Hyperfilm (GE Healthcare). The sizes of the resulting labeled primer extended products were inferred from their co-migration with a manual sequencing reaction, which was obtained using the same primer with a promoter-containing clone.

Northern Blot:

Tissues and cells were harvested and processed for isolation of total RNA as described above. Total RNA separated on formaldehyde agarose gels (15 μ g/lane) and transferred onto nitrocellulose membrane by capillarity migration overnight. Pre-hybridization was carried out at 42°C for 2 h in pre-hybridization buffer (6X SSC, 50% formamide, 5X Denhardt's, 1% SDS, and 200 μ g/ml denatured salmon sperm DNA). Linearized cDNA probes (1172 pb

obtained from pSK-Myc HR plasmid vector previously described (Brancaz -Bouvier et al, 2007) and cut by *Xba I-Hind III*) were radio-labeled by random-priming and heat denatured. Hybridization was carried out for 16 h at 42°C in pre-hybridization buffer. Blots were washed twice for 5 min at RT in 7X SSPE, 0.1% SDS, 1 time at 37°C in 1X SSPE, 0.5% SDS for 15 min and 1 time for 1 hour in 0.1X SSPE, 1% SDS at 65°C. Blots were exposed to Hyperfilm (GE Healthcare) at –80°C overnight.

Cell culture and transient transfection assay:

Cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). Media and reagents for cell culture were purchased from Gibco (Invitrogen) unless otherwise indicated. Mouse fibroblast cell line (NIH 3T3) and mouse pituitary gland cell line (GHFT1) were maintained in DMEM high glucose (4,5g/L) medium containing L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C under 5% CO₂. Cells were plated on 12-well plates, each well containing 3x 10⁵. Following a 24-h incubation, cells in each well were transfected with 1,5 µg of total plasmid constructs DNA (including promoter-reporter constructs, pRLTK-Luc, pSK as empty vector, etc.) using the SuperFect Transfection Reagent according to the manufacturer's instructions (QiaGen). The pRLTK-Luc plasmid was co-transfected to normalize the variation in transfection efficiency. pRLTK-Luc encodes the *Renilla* luciferase, and its activity can be distinguished from that of the firefly luciferase encoded in pGL3b in the Dual-Luciferase Assay System (Promega). After 12 h of transfection, the cells were washed with phosphate-buffered saline and then maintained in fresh medium including or not a ligand treatments (100nM Vitamin D3 and 100µM Thyroid hormone T3), depending of the experiments, for 12 h more prior to luciferase assay. In each experiment, the pGL3b plasmid was also transfected in separate wells to compare the specific activity of promoter-reporter constructs with the basic activity of the promoter-less plasmid.

Dual Luciferase Activity Assay:

Activities of the firefly luciferase and *Renilla* luciferase in a single sample were measured sequentially using the Dual-Luciferase Reporter Assay (DLRTM) system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline and then lysed in 200 µl of Passive Lysis Buffer at room temperature for 15 min. 20 µl of cell lysate was quickly mixed with 100 µl of Luciferase Assay Reagent II in a

luminometer tube. The light emission for the firefly luciferase was recorded immediately for 2s after a 3s pre-measurement delay using a Lumat LB 9507 Luminometer (EG&G Berthold). Subsequently, 100 µl of Stop & Glo reagent was added to the same tube to inactivate the firefly luciferase while activating the *Renilla* luciferase. The light output from the *Renilla* luciferase was integrated under the same conditions. Variation in transfection efficiency was normalized by dividing the measurement for the firefly luciferase activity by that for the *Renilla* luciferase activity. The luciferase activity of a construct plasmid was expressed as relative to that of pGL3b in Relative Luciferase Units (RLU).

DNA Constructs:

cDNAs encoding the wild-type human VDR (gift from Dr. Hindrich Grosmeyer) and TR α 2 (gift from Dr. Olivier Chassande) were subcloned into pcDNA3-Flag expression vector. Mouse genomic PCR was used to generate fragments with the following primers:

Primer 1: 5'-AGCGCTCGAGGTACCTAGCTAGTAAGTGGCAG-3':nt -2388 to nt -2357

Primer 2: 5'-CACCACGGTCATATCTCCAAGTGTGGC-3':nt -1747 to nt -1721

Primer 3: 5'-TGGA ACTAAGGTGACACGGCACAG-3' nt -1598 to nt -1575

Primer 4: 5'-GAGTTAGGGGTCCTGGCAGGCACTG-3'nt -837 to nt -813

Primer 5: 5'-GAAATGGGGATGTGAACCTGAACAG-3'nt -793 to nt -769

Primer 6: 5'-CGAGCAGAAAGGACAGCATCTACCC-3'nt -553 to nt -529

Primer 7:5'-GAAGTGTGGAGATGCTGCGGGAGCC-3'nt -515 to nt -485

Primer 8: 5'-CTGTGGCTTGAGGCCTGGTAGTGGCC-3' nt +443 to nt +461

Construct 6: Primers 4 and 7 were subcloned in pGEM-T Easy (Promega), digested by *HindIII-SacI* and cloned in pGL3b (Promega). Construct 5: Primers 6 and 8 subcloned in pGEM-T Easy (Promega), digested by *HindIII-EcoRI* and subcloned in pSK II(-), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b (Promega). Construct 3: Construct 6 in pGEM-T Easy was digested by *HindIII-Sall* and subcloned in Construct 5 in pSK. This new construct was digested in *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct 8: Primers 1 and 3 subcloned in pCR2.1 (Invitrogen), digested by *KpnI-EcoRV* and cloned in pGL3b (itself digested by *KpnI-SmaI*). Construct 7: Primers 2 and 5 were subcloned in pCR2.1 (Invitrogen), digested by *KpnI-EcoRV* and cloned in pGL3b (itself digested by *KpnI-SmaI*). Construct 2: Construct 8 was digested by *HindIII-StuI* and subcloned in Construct 7 in pCR2.1. This new construct was digested by *KpnI-EcoRV* and cloned in pGL3b (itself digested by *KpnI-SmaI*). Construct 4:

Construct 8 was digested by *HindIII-StuI* and subcloned in Construct 7 in pCR2.1. This new construct was digested by *KpnI-SacI* and cloned in Construct 6 in pGL3b. Construct 1: Construct 3 in pGL3b was digested by *HindIII* and cloned in Construct 2 in pGL3b dephosphorylated. Construct 9 is pGL3b.

Deletion analysis of the RE1 fragment was performed by generating constructs A to F through PCR cloning of construct 5 truncations in pGL3b. The following primers were used:

Primer A: 5'-CGGGGTACCATCTCCACACTTCCCTTCC-3':nt -504 to nt -485

Primer B: 5'-CGGGGTACCACCCCAAGCATGGCCA-3'nt -423 to nt -406

Primer C: 5'-CGGGGTACCTGTCTGAAGGATGGAGGG-3'nt -368 to nt -350

Primer D: 5'-CGGGGTACCGGCAGTCCCCGCTCT-3'nt -279 to nt -263

Primer E: 5'-CGGGGTACCAGCTTGGCCTGACTCTCC-3'nt -224 to nt -206

Primer F: 5'-CGGGGTACCTACTCTGCCTGAGGGGTA-3'nt -158 to nt -140

Construct A: Primers A and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct B: Primers B and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct C: Primers C and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct D: Primers D and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct E Primers E and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b. Construct F: Primers F and 8 were used in PCR (with construct 5 in pGL3b), digested by *KpnI-SmaI* and cloned in pGL3b.

Bioinformatic analyses:

Genomic DNA sequences localized upstream the mouse, rat and human *Hr* gene (GenBank Accession Nos. NC_000080, NC_000008 and NC_005114 respectively) were taken from the ElDorado genome annotation database (Genomatix Software, Release 11/2007) and GenBank database (NCBI). The sequences were analyzed for phylogenetically conserved consensus motifs for transcription factor binding sites (TFBS) using the program FrameWorker (Genomatix Software) and BLAST (NCBI). The mouse, human and rat promoter region analysis was performed using MatInspector program (Genomatix Software, MatInspector Release professional 7.4.8.2, July 2007), [24].

Electrophoretic Mobility Shift Assay:

Plasmids pcDN3-Flag VDR and pcDN3-Flag TR α 2 was transfected for 24h in 60 mm dishes using SuperFect Transfection Reagent (QiaGen) according to the manufacturer's instructions. Treatment was applied 12h after the transfection. Cells were scraped with 1 mL PBS 1X, centrifuged at 2 000 rpm for 5 min at 4°C, flash-frozen in liquid nitrogen. Proteins were extracted with 3 volume of Buffer C (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% Glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA) for 10 min in ice and tube was centrifuged at 12 500 rpm for 5 min at 4°C. At the end, anti-proteases were added: 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM pepabloc, 1 μ g/mL Leupeptin, 1 μ g/mL Pepstatin. Construct 5 in pSK was digested respectively by *Hind* III-*Msc* I (sequence 1 nt -527 to nt -409), *Hind* III-*Eag* I (sequence 2 nt -527 to nt -321) and *Hind* III-*Bmg* BI (sequence 3 nt -527 to nt 260) and each fragment was labeled with [γ ³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (NEB). Double-stranded DNA fragments used as probes were obtained by annealing complementary custom synthesized single-stranded oligonucleotides. Approximately 150 fmol of DNA was added to 10 μ g of nuclear extract in a final volume of 25 μ l containing 0.2 μ g of poly(dI-dC), 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, bovine serum albumin (50 mg/ml), 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and 1 mM dithiothreitol. Following incubation at room temperature for 20 min, DNA-protein complexes were resolved by electrophoresis at room temperature through an 8% polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide 80:1) with 90 mM Tris borate (pH 8.5), 2 mM EDTA buffer. The gels were dried and subjected to autoradiography with PhosphorImager. Competition experiments included the addition of unlabeled DNA fragments to the reaction mix.

Acknowledgements

We thank Dr Olivier Chassande for the TR α 2 expression constructs and Dr. Henry Gronmayer for supplying the VDR and RXR plasmid constructs. This work was supported by the "Emergence" grant of the Region Rhône – Alpes and by the French "Fondation de la Recherche Médicale" (SN). EF had a PhD fellowship of the French Ministry of National Education. We appreciate the helpful discussion and encouragements from Drs John Sundberg, Catherine Thompson and Angela Christiano. We are grateful to Brigitte Peyrusse for her kindness, punctuality, and skilful artwork.

Figures Legends

Figure 1. Determining the cap site of the mouse *hairless* gene. A. Expression of the *Hr* gene in various tissues and cultured cell lines. A specific transcript of 7,5 kb is detected by Northern blot in skin, brain and heart, as well as in pituitary gland derived GHFT1 cells. B. Primer extension analysis with a 5' specific oligonucleotide. Note the 645-660 bp fragment produced in different organs and cell types. C. A second primer extension reaction yielded a 169 bp product, run along with a sequencing gel that allowed to identify precisely the cap site of the mouse *Hr* gene.

Figure 2. Nucleotide sequence (- 2388 bp to + 737 bp) containing the mouse *Hr* gene promoter region. The cap site of the mouse *Hr* gene is situated 4 kb upstream of the HR protein translation start site (in the second exon of the mouse *Hr* gene). The oligonucleotides used for primer extension and sequencing reactions are shown in green. Putative transcription factor binding sites are coloured in red. The 1,1 kb regulatory element essential for the mouse *Hr* gene promoter function is dashed in blue. The punctuated line designates the 3200 bp separating this sequence from the mouse *Hr* gene ATG.

Figure 3. Identification of the RE1 (Regulatory Element 1) by deletion analysis. A. Deletion derivatives (constructs 1 to 8) of the 3 kb upstream region shown in Figure 2 were cloned in the pGL3 luciferase reporter vector (construct 9). B. Luciferase reporter expression in transfected NIH 3T3 (green) and GHFT1 (orange) cells. See Material and Methods for details of the transient transfection assay. Note that constructs 1, 3 and 5 are able to drive high levels of reporter activity, while the derivatives lacking the RE1 (constructs 2, 4, 6,7 and 8) do not sustain luciferase transcription.

Figure 4. REI contains thyroid hormone and vitamin D response elements. A. An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with double-stranded radiolabelled VDRE and TRE specific nucleotides incubated with extracts from cells transfected with Flag-tagged VDR and TR α 2. Notes the main complexes 1 and 2 arrowheads in lanes 2 and 3. Shifts are observed on lanes 2 and 3. No band shifts are detected in reactions with sequence 1. Transient cotransfection of NIH 3T3 (B) and GHFT1(C) cells with a construct of luciferase reporter coupled RE1 together with TR/RXR and VDR/RXR expressing plasmids in the presence or

absence of the respective ligands, T3 thyroid hormone and vitamin D. Cotransfected cells were seeded in 60 mm plates at a density of about 3×10^5 cells and then incubated overnight in the presence 100 μ M T3 and 100 nM of vitamin D. The components of each transfection (Co1 to Co3) are indicated by + or -.

Figure 5. Functional analysis of the RE1 components. A. Serial truncations (A to F) of the 1.1 kb *Hr* gene upstream regulatory element. The putative vitamin D response elements (VDREs) 1 and 2 are coloured in green (V1 and V2), while the presumptive thyroid hormone response element TRE (T) is shown in red on the respective constructs. The newly described regulatory element UE60 is marked in dashed. Construct G represents the pGL3 basic luciferase gene containing construct (see Material and Methods). B and C. Transient transfection assays of NIH 3T3 cells (B) and GHFT1 cells (C) showing the effect of RE1 regulatory motifs on gene transcription. Note the sharp loss of luciferase reporter activity when the UE60 element and the TRE are removed in the presence or absence of the respective ligand. Luciferase activity is expressed in Relative Luciferase Units (RLU).

Figure 6. The TRE element is essential for RE1 function. A and E. Transient cotransfection assay in the presence or absence of thyroid hormone T3. Here NIH 3T3 cells (A) and GHFT1 cells (B) are cotransfected with constructs RE1, A and D together with the TR/RXR receptors dimers. D. Reporter activity is dramatically reduced after removal of UE60 in cotransfection of NIH 3T3 cells, while it remains at high levels in the presence or absence of T3 in cotransfected GHFT1 cells.

Figure 7. The *Hr* gene upstream regulatory modules are highly conserved in Mammals. The positions of a number of putative binding sites for transcription factors are indicated with respect to the *Hr* gene's ATG in the three species. The precise locations of the promoters on mouse, rat and human chromosomes are marked. The binding sites identified and analysed in this work are shown in red (UE60), blue (TRE) and green (VDRE). The consensus sites for other upstream factors are presented in orange (Hoxa9 and Hoxb9), black (RAR/RXR/ROR), purple (Lef1) and grey (Sp1).

References

1. Cachon-Gonzalez MB, Fenner S, Coffin JM, Moran C, Best S, Stoye JP: Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(16):7717-7721.
2. Ahmad W, Faiyaz ul Haque M, Brancolini V, Tsou HC, ul Haque S, Lam H, Aita VM, Owen J, deBlaquiere M, Frank J *et al*: Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* 1998, 279(5351):720-724.
3. Cichon S, Anker M, Vogt IR, Rohleder H, Putzstuck M, Hillmer A, Farooq SA, Al-Dhafri KS, Ahmad M, Haque S *et al*: Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia. *Hum Mol Genet* 1998, 7(11):1671-1679.
4. Ahmad W, Zlotogorski A, Panteleyev AA, Lam H, Ahmad M, ul Haque MF, Abdallah HM, Dragan L, Christiano AM: Genomic organization of the human hairless gene (HR) and identification of a mutation underlying congenital atrichia in an Arab Palestinian family. *Genomics* 1999, 56(2):141-148.
5. Thompson CC, Bottcher MC: The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(16):8527-8532.
6. Potter GB, Beaudoin GM, 3rd, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC: The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 2001, 15(20):2687-2701.
7. Potter GB, Zarach JM, Sisk JM, Thompson CC: The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol* 2002, 16(11):2547-2560.
8. Hsieh JC, Sisk JM, Jurutka PW, Haussler CA, Slater SA, Haussler MR, Thompson CC: Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem* 2003, 278(40):38665-38674.
9. Moraitis AN, Giguere V: The co-repressor hairless protects RORalpha orphan nuclear receptor from proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 2003, 278(52):52511-52518.
10. Beaudoin III GMJ, Sisk JM, Coulombe PA, Thompson CC: Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(41):14653-14658.
11. Thompson CC, Sisk JM, Beaudoin GM, 3rd: Hairless and Wnt Signaling: Allies in Epithelial Stem Cell Differentiation. *Cell Cycle* 2006, 5(17).
12. Brancaz MV, Iratni R, Morrison A, Mancini SJ, Marche P, Sundberg J, Nonchev S: A new allele of the mouse hairless gene interferes with Hox/LacZ transgene regulation in hair follicle primordia. *Exp Mol Pathol* 2004, 76(2):173-181.
13. Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB: Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(18):9831-9835.

14. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y *et al*: Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 1997, 16(4):391-396.
15. Miller J, Djabali K, Chen T, Liu Y, Ioffreda M, Lyle S, Christiano AM, Holick M, Cotsarelis G: Atrichia caused by mutations in the vitamin D receptor gene is a phenocopy of generalized atrichia caused by mutations in the hairless gene. *J Invest Dermatol* 2001, 117(3):612-617.
16. Thompson CC: Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci* 1996, 16(24):7832-7840.
17. Engelhard A, Christiano AM: The hairless promoter is differentially regulated by thyroid hormone in keratinocytes and neuroblastoma cells. *Exp Dermatol* 2004, 13(4):257-264.
18. Panteleyev AA, Paus R, Ahmad W, Sundberg JP, Christiano AM: Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans. *Exp Dermatol* 1998, 7(5):249-267.
19. Bernard BA: Hairless and genetic disorders of hair. *Medecine Sciences* 2002, 18(3):276-280.
20. Nonchev S, Brancaz MV, Folco E, Romero Y, Iratni R: [The mouse hairless gene: its function in hair root and at the heart of a subtle pleiotropy.]. *Med Sci (Paris)* 2006, 22(5):525-530.
21. Potter GB, Facchinetti F, Beaudoin GM, 3rd, Thompson CC: Neuronal expression of synaptotagmin-related gene 1 is regulated by thyroid hormone during cerebellar development. *J Neurosci* 2001, 21(12):4373-4380.
22. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorium A, Lallemant B, Zhang R *et al*: Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 2005, 19(11):2685-2695.
23. Tavera-Mendoza L, Wang TT, Lallemant B, Zhang R, Nagai Y, Bourdeau V, Ramirez-Calderon M, Desbarats J, Mader S, White JH: Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. *EMBO Rep* 2006, 7(2):180-185.
24. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T: MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005, 21(13):2933-2942.

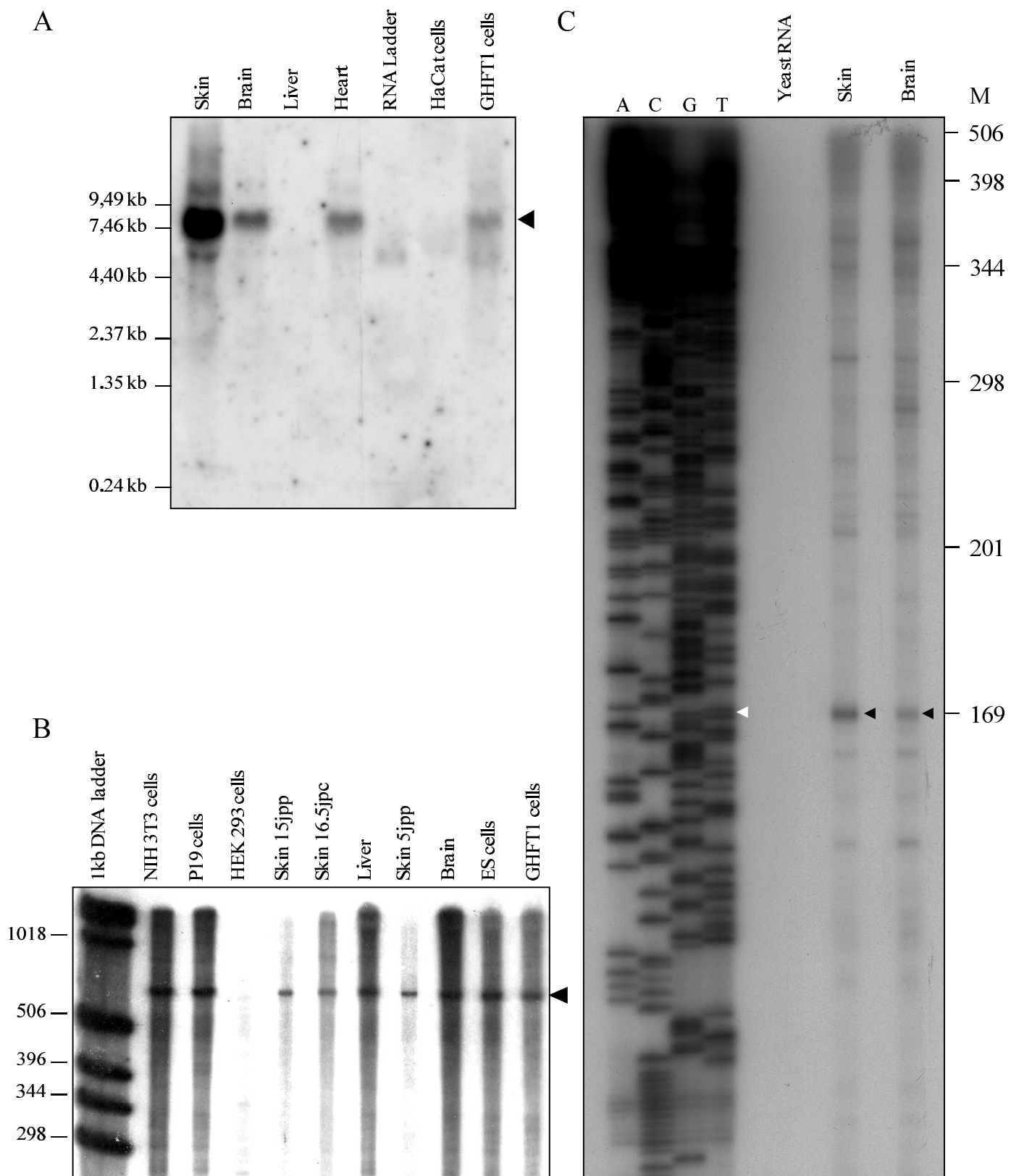


Figure 1

-2388 AGCGCTCGAGGTACCTAGCTAGTAAGTGGCAGGATTGGGCTTTGGACCAGGCAGTCTGGCTCCAGAGTTGATGTT
CTTAATCACTATTTCAGTAAATGGGCTGTTCCCTTGCCTGGGGGGCGGGGGCA Sp1 GGGAGAAGGAGTCTGGCATGTGTGG
GATATTTGTTGCTCGCCTGACCTTGTGCTGAGCAITTCAGAGCTGGTTTCTTTGAATCTTC LEF1/TCF GCAAAGGGCCTGTT
2088 GTCCATCTTACAGGTGAAACGGTTTCTCCTCTATAGAGTGCTGCCCGAGAGGTGGGCAAAGTCACTTGGTCCT
CCTGGGAGGACTGCTGAAGCCACTGTGCCCTGGCTCTGCAGAGCCACCTCTGCCCTCCCCAGCCCTGCTTTGTT
CTCCTACTCCAACCTCATACACCTGTCTCAGAACCTCTGCGCGCATGCCCTCTGCCCTAGCCACTCACGGAG
AGACTTCAGCCTTATTTTTTACTGTTGTATCCCAGACTACATGGTTGAACCAAGGTGTGATATTTTTTATAAC TGTG
HOX A9
TGATTTGTTGGTGAATCCTGCTTAGCGTCTAACTTCTGCACTGAAACGTCACCCCTTCCTCTGAGAAGCCTCTC
TCACTCCCCAGCATAGGATTAGAAGTCGTGGAGTCACCTTGTCAACCGGTCATATCTCCAAGTGTGGCTCCCAGC
CTCAGCTCAAGGCCTGACACCCATCCGAAGCCTGAAAGAGGATTGTGACTAAACCAACACATACATCAACATCT
HOX B9
-1638 TAAACCTCTTCAGGGTGGGAGTGAACTTTTGCTTTGGTGGCTGTGCCGTGTACCTTAGTTCACCACACAGCTT
TCAAAACACCCAGTGTCTCTGTTATGGCTTGGTGAATGGCTGGGTAAAAATCACATGGTTACTAAGCATCCTGAGGC
CACAGAAAAACAAATGTGTAGAAGGTCCAGGTGGTAGGCATTTCTGGGCAAGCATAAATGTGAGCCAAGACTTGG
GGCACTGGGTAGCAACCTGGACATCCCTCAGAACAGCTCTGAGAACTACCCAAACACACCTTCGCCAACACTAT
HOX B9
CCTCCCTTGAAAAGAGCCCTGGACCACCACTGATGCTCTGGCCTGGCCTCTTAAAGGGAGG GCATCTGGTCTTG
TTCTACTTTTCAAGGACTACCAACTTTCTACTTGAGACCAGTGTCCCTGGTCTCCTCCCCAGATAGGATCAAGG
TTGAAAAGGACCTGACACCAGAGACCAGTCCCTAGCACATACCTTCTGTGAGTTCCTGGTCCCACCCCACTCCT
CAGCTTTTCTACTCTTCTGGCCTGTACCATGACAGCCGGGACTTCTCTCACAGTCTTTCTCTCTCCACTT
-1038 CACCTCTTGCCATCCTTTTAAACCTCTGCCTCTGACTCCATCACTGTCCCTCTGACCTGTGGCCCTTCATTAG
CCTGGTCACTTTCCCTTCTCTGGATTCTGTACAGCACACAGGATCCTGTGGCTTTATTTTTTAGCTGCCACTCC
CAGCAGCATCCTAAGCCTCTGGGTCCACACATGCAGCCCTAGCCCAGGCTGAGTTAGGGGTCTGGCAGGCACT
GGAGGAGCTCCAGGGGGTAACTGTTTCAGGTTTCACATCCCCATTTCTCACCAGCATCTGAGATTGGTGCCCACTA
GC Box
ACAAGCGACCTTCACCGCTGGTTCCTAGGGTTGGGGGATCTGGGGGGCAGAGCTG GCATCGTTGCACACACAGGT
CCCAAGCTCAGCCTGGAACACAACGCAGGCTAGATGGCAGTGGGGGAGGGCTAGAGAGAGGAAGGGCTCCA GAAG
RORα2/RAR/RXR RREB1
AGGAATTAGGTCAAGGATGTGGTGGGTGGGCGAGCGAGCAGAAAGGACAGCATCTA CCCCAGCTTCCTCC TGG
CTCCCGCAGCATCTCCACACTTCCCTTCCCTGTCCCTCCCCCTGGTCCCTGGGAGATTCTTCGCCCTGTATCCC
VDRE
CCTTCCCCATGCCCCCACCACAAGCATGGCCACAGGGGTGGG GGTGGGGTAGGGGGAGGCCAGCCTC AGCTGTG
TRE
-363 TGAAGGATGGAGGGGCTGGGGAAGCAGGGCTAGGTGCCAGACGGCCGCGTGTGTGGGAGGGG ATGTCTCAGAT
GCCCTCCACC CGGCAGTCCCCGCTCTGACGTGGGTGCCCCCCTCTCCCCGCGCGATTAGTGGCAGCTTGGCCT
GACTCTCCGGGGCTCCTTCCCCGCGCTGCCTGTGCCCACCCCTGGGCAGGGGGCTACTCTGCCTGAGGGGTAC
TGTGCTTGCCAGGTAAGGGTCTCTGGGGTGGAGAAAGGGCAGCCGGCTGTGAGAGTCTGTGCCTGTGAGCAA
VDRE (+1)
-39 CGAGTGTGTGTCAGCATGTGTGTCAGTTTGTGAGGG GTCGGGGTGGGTGAGGGCTGGGCCC ATG TGAGTCTGGGG
GTGCTAGTAAGTTTGCAGGTCCATGGTCTGGTCTTGTGACCACACACTGGGTGGCTTCCCCCCCCCAGGAGCG
←
CCCTCCCCCGTGTTTGTGTCTTTTGTGTATGTCTCAGCTCTGCTCCATCCTCAGGCACAG CACAGCCAGCTGCA
AGGACTCTGGCCTGTGGCATAGGCTCTAAGGCAAGGATGGGGAACGTGGTGGAGTGAGGGCAGTACTTCTCCTCA
CCTTCATCTCCACTAACCCTAAGCATTCCAGAAGACTGTCTGAGAGCTCTGGTCTAGTCCAGGCAATATAATC
TGACAGGCAGATATGGCGACTGGAGGTGCGGGGGTGGGTATCTGTTTCAGTCCCCTGACACAGTCCCCTATCACCT
+388 TAGGGGAAGACAGCCACAAGCCCCAGGACTCAGGACAGCCCCGGGTTCACCTCTGGCCACTACCAGGCCTCAAG
RORα2/RAR/RXR
CCACAAGCCACAGGACTCTCCACAAGCCTCTCTAAGGTAGGCCAGGGAACCTTAGATGGGGGCCACAGGCACGT
VDRE
GCCACCCACCAACCTGCCCTGGAGCCAGGAGCCAGAGGTACGGCTAG ACCCCCTGCTGCTCCAGTCCCTGTTAG
←
ACCTCCTCATTTCCGCTCCCA CAGCAACTAAGGTCAGGTCACCTC CAAAGGAGTGGATAAGAAAAGGAGTATGA
+737 AAACCCAGCCATGTAAACAACCCCTGCCAGCCTGCCACCACAGACTTG -----

ATG
+3935 bp

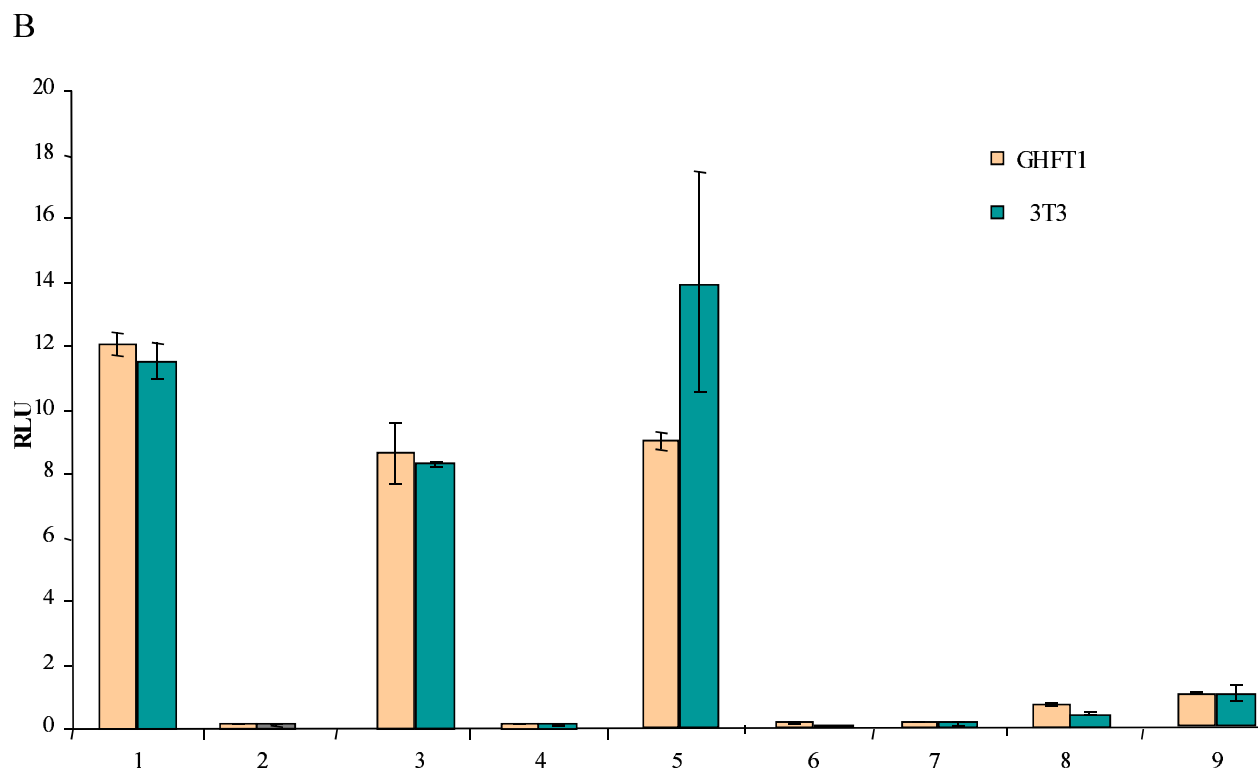
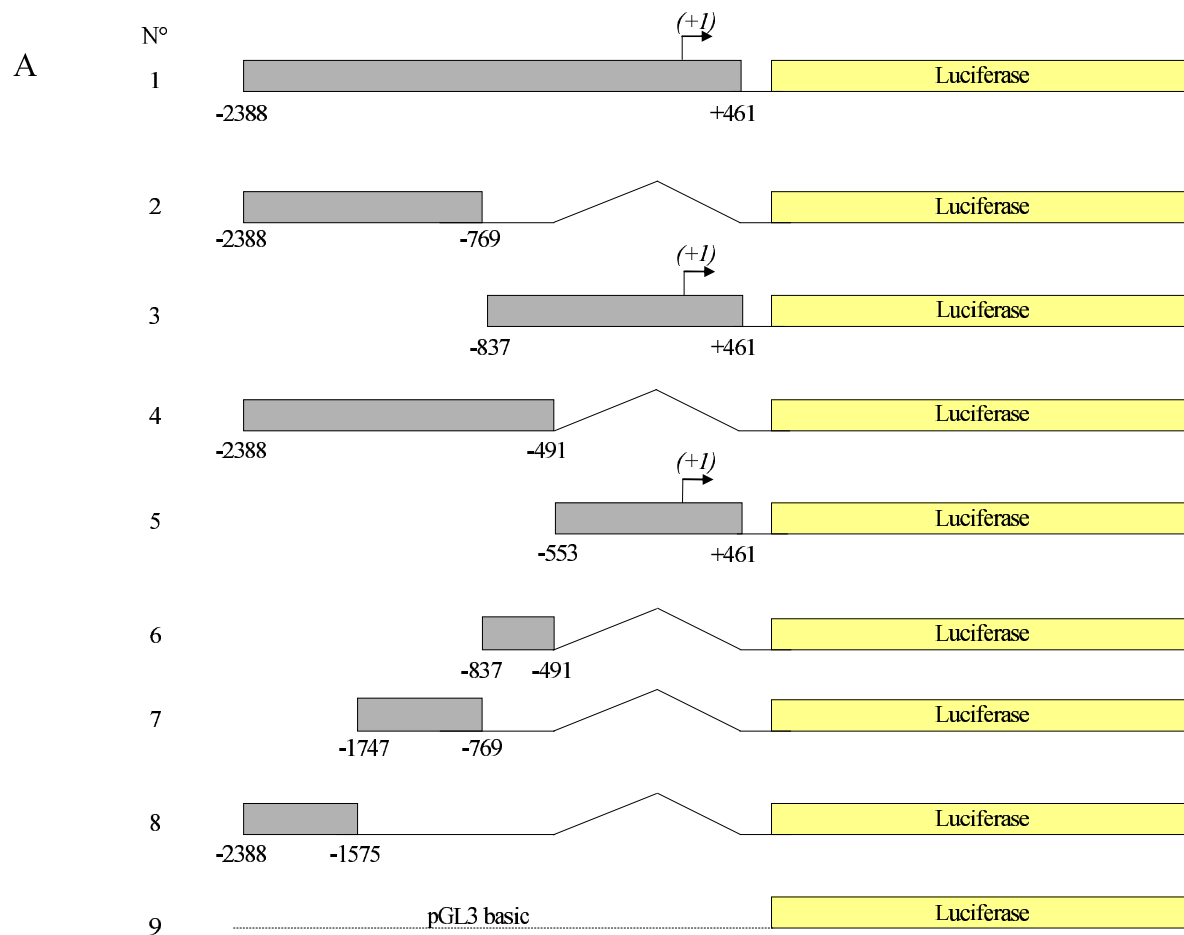


Figure 3

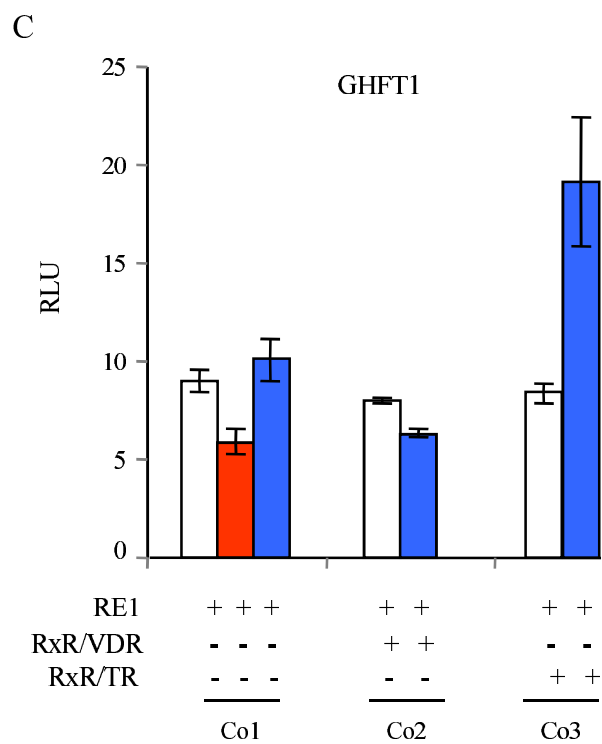
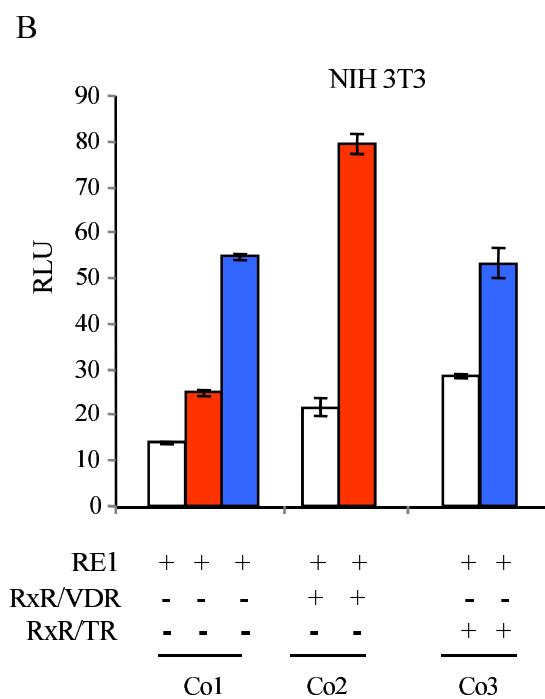
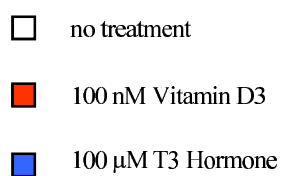
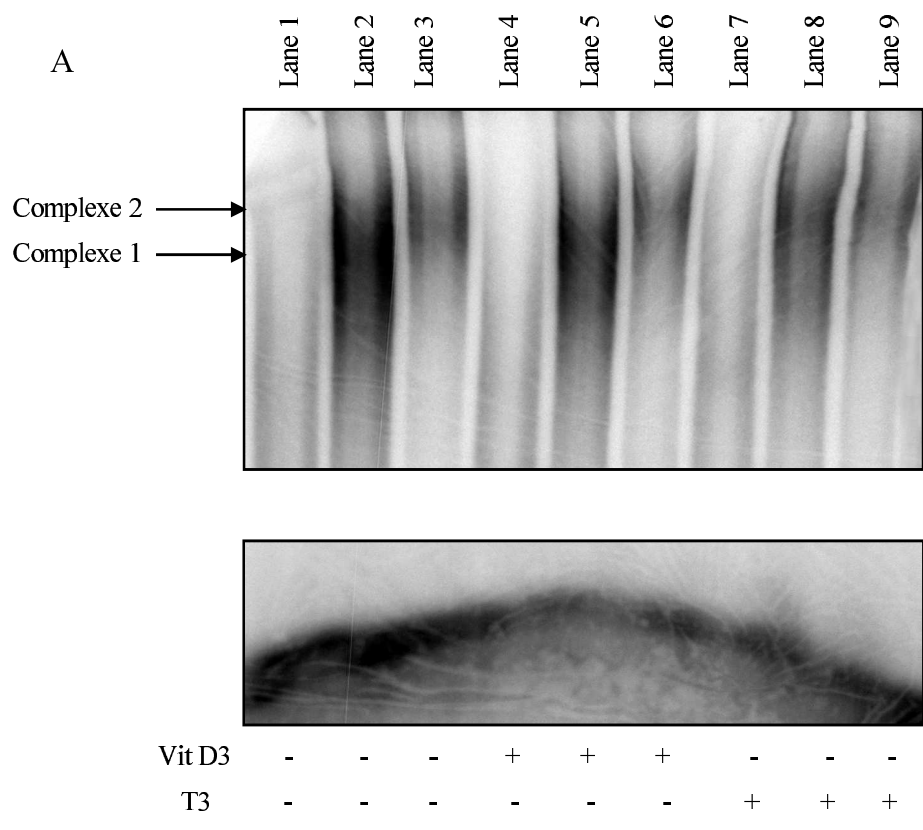


Figure 4

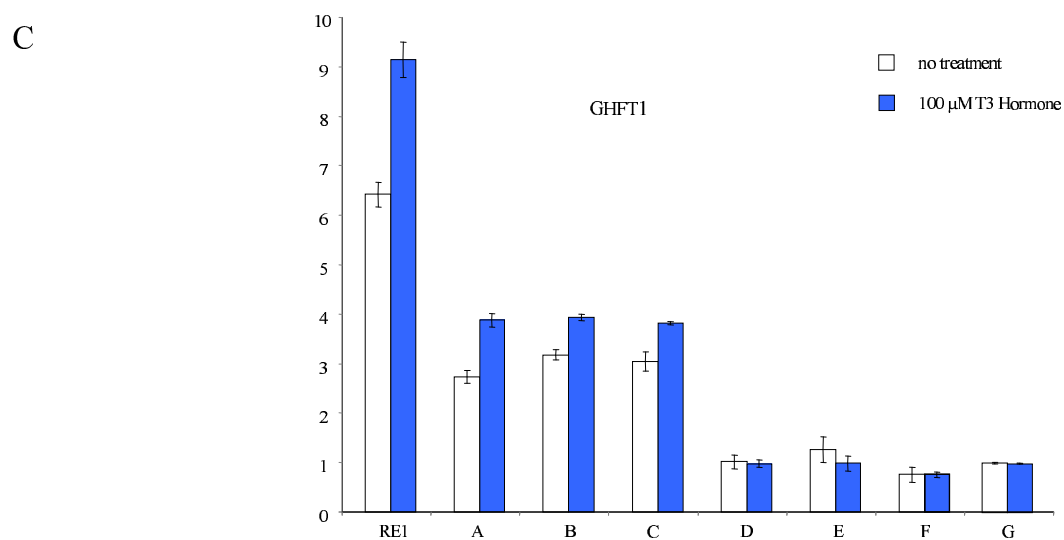
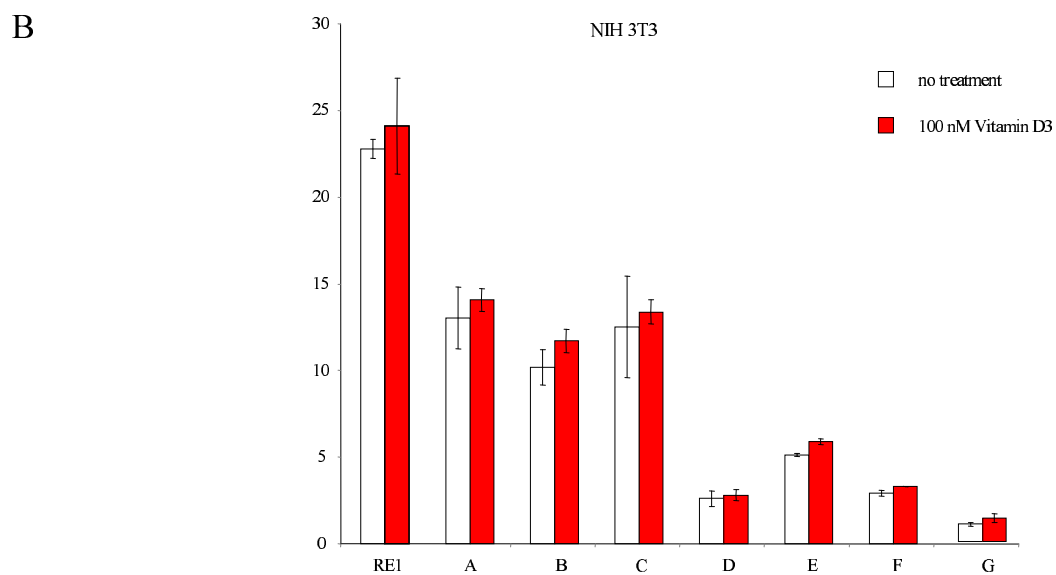
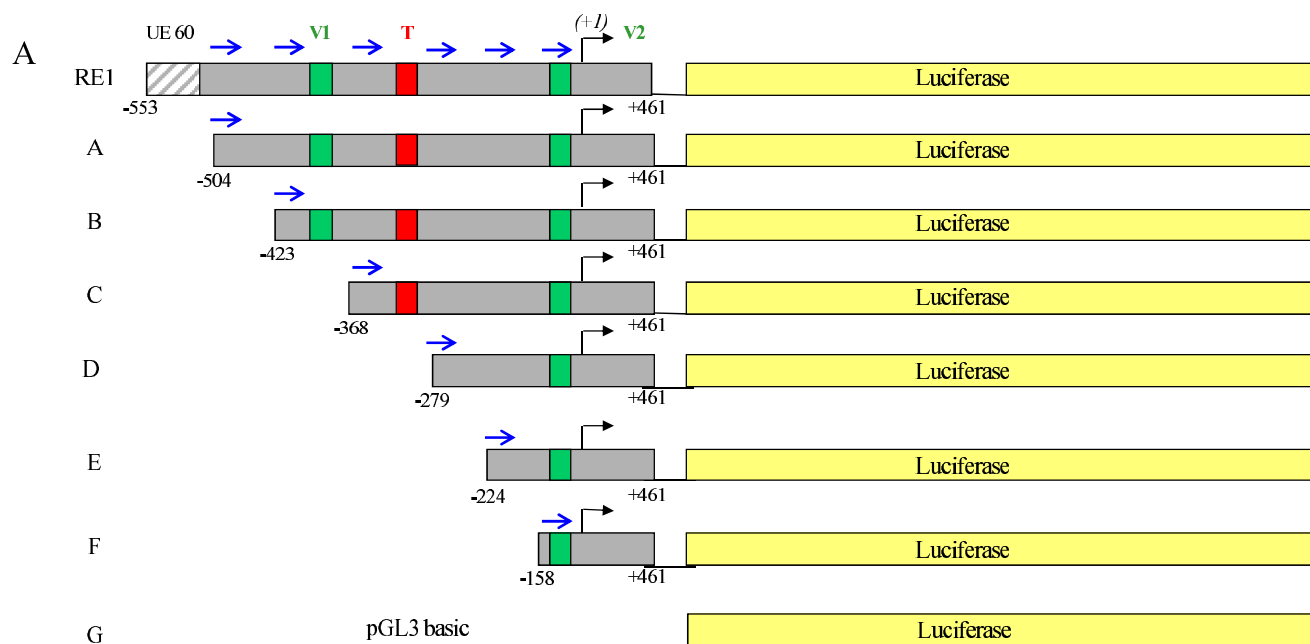


Figure 5

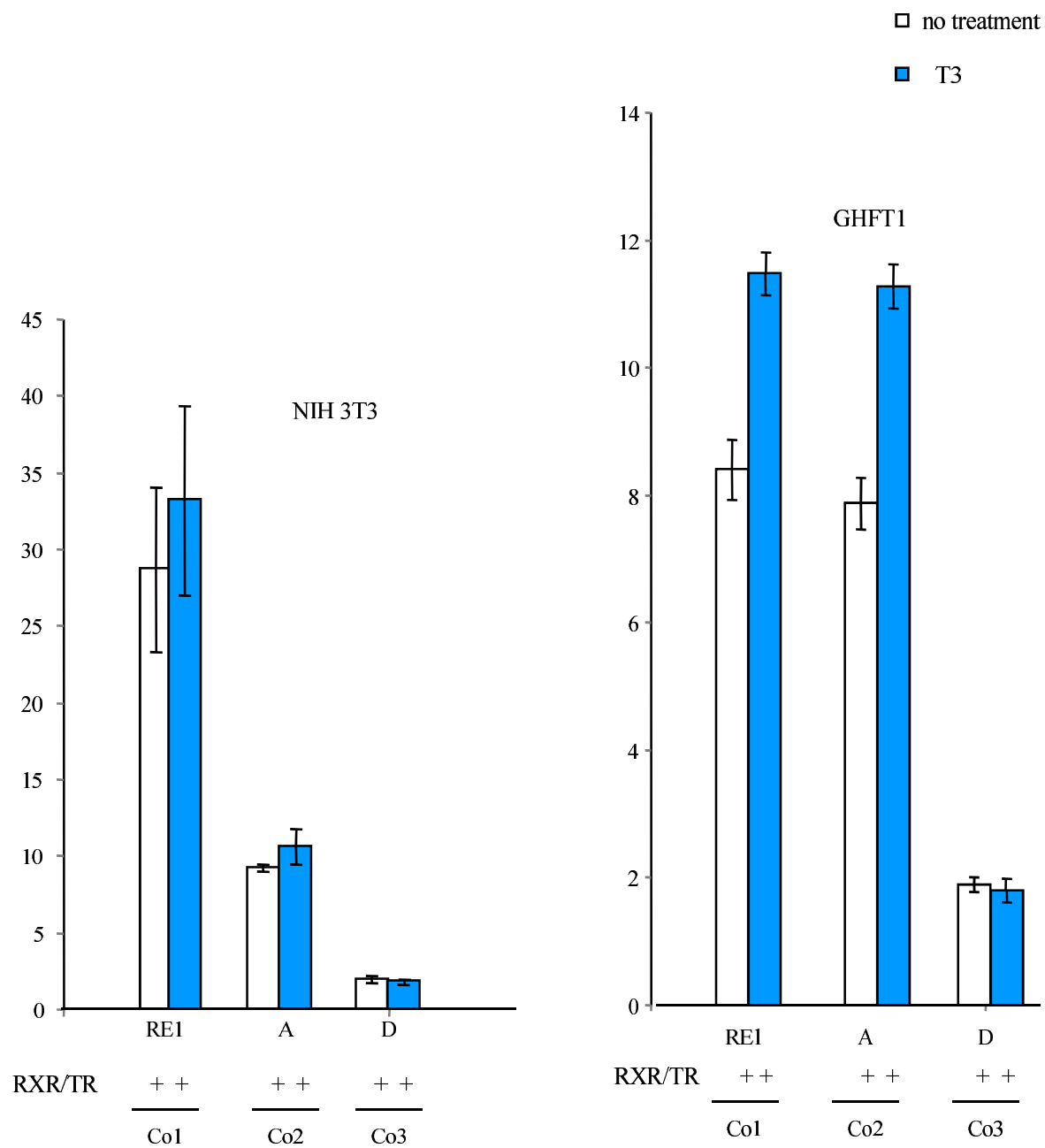
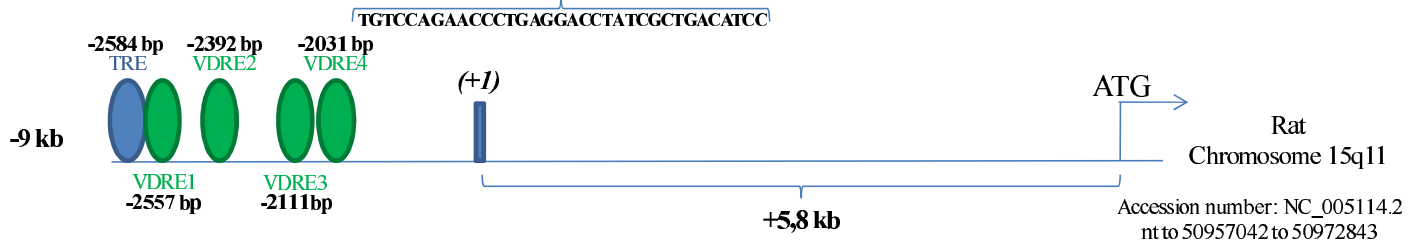
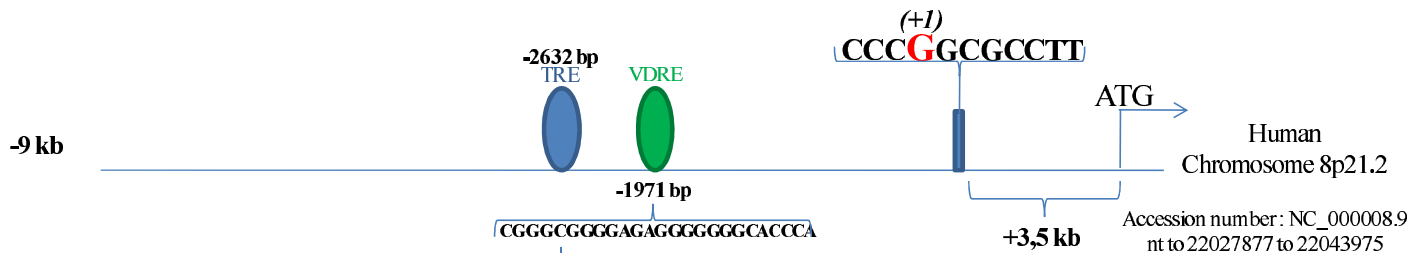
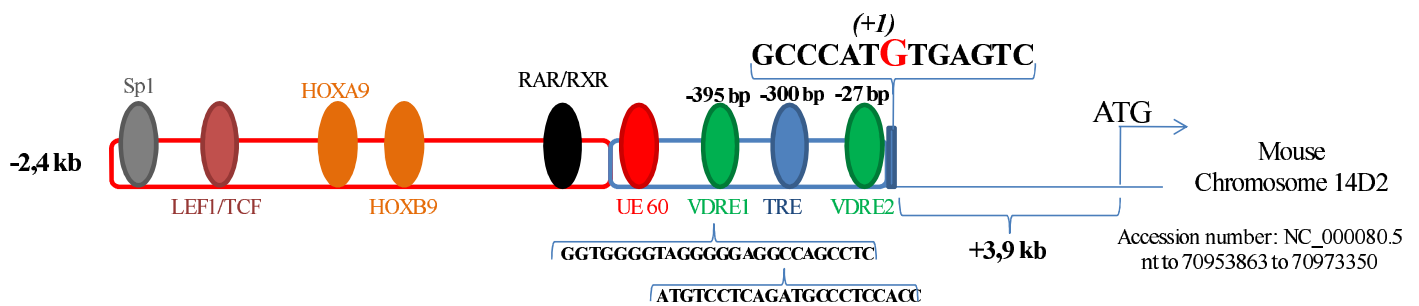


Figure 6



TRE: TGTCCAGAACCTGAGGACCTATCGCTGACATCC

VDRE1: GGGTGGGTGGGGGAGAGAAAGGAT

VDRE2: GGGTGGGGTGGGGGAGGCCAGCCT

VDRE3: CTGTGGGGTGGAGAAAGGCAGCCG

VDRE4: GTGAGGGGTGGGTGTGGCTAGGGC

2.2 Publication n° 2

2.2.1 L'allèle *Hr^{rhbmh}* code pour une protéine Hairless mutante dont la localisation sub-cellulaire est perturbée

Cette partie de mon travail a été réalisée en collaboration avec Maud-Virginie Brancaz-Bouvier, étudiante de thèse dans le laboratoire, qui a soutenu son doctorat en 2004.

Comme il a été souligné dans l'Introduction, pour aborder l'étude fonctionnelle du gène *Hr*, notre laboratoire utilise comme modèle les souris hairless rhino bald Mill Hill, une mutation qui est apparue spontanément à l'Institut National de la Recherche Médical, à Mill Hill, Londres en 1998 et qui a été transférée pour des analyses morphologiques et moléculaires à Grenoble la même année. Dans notre équipe, il a été montré que cette mutation se traduisait par une délétion de 296 pb au niveau de l'exon 19 du gène *Hr* [177].

Le travail que nous avons effectué dans le cadre des deux thèses consistait à comprendre l'effet moléculaire de cette délétion. Ma participation a été liée à la purification de l'anticorps anti-HR, à l'étude des activités de répression de la transcription de la protéine mutante HR et à l'interaction entre HR bmh et ses partenaires cellulaires, en particulier, le récepteur de la vitamine D (VDR) aussi bien en culture cellulaire que chez les mutants bmh.

L'expression du gène *Hr* a été étudiée à différents stades embryonnaires (E12,5-E18,5) et au cours des premières semaines de développement post-natal chez des mutants bmh par RT-PCR et par hybridation in situ. La localisation et l'intensité des transcrits détectés suivent les mêmes profils chez les individus de type sauvage que chez les *Hr rhbmh*. Les cellules de la placode du follicule pileux et du bourgeon du poil sont fortement marquées chez les embryons, alors que l'ébauche pileuse des individus nouveau-nés présente un patron caractéristique d'intense coloration de la gaine externe et de la matrice du poil. Cette absence de différence entre les deux génotypes indique que le gène *Hr^{rhbmh}* est transcrit correctement au cours du développement embryonnaire et dans la période post-natale chez des mutants bmh et que les causes du phénotype observé se situent à un autre niveau de régulation.

En clonant les ADNc des gènes mutant et normal dans des vecteurs d'expression, nous avons alors constaté, par des expériences de traduction in vitro aussi bien que par des transfections des deux types de construction dans des cellules Cos, que la protéine HR bmh était plus longue que sa forme de type sauvage. Ce résultat confirmait l'hypothèse que la délétion originale au niveau de l'exon 19 chez les souris bmh supprimait un codon stop et avait comme résultat la production d'une protéine à 117 acides aminés de plus que la protéine de type sauvage. Comme preuve ultime de cette anomalie, nous avons obtenu des extraits de protéines de peau d'individus des deux génotypes que nous avons faits migrer et analysés par Western blot. En utilisant notre anticorps purifié anti-Hairless, généré contre les peptides de la partie N-terminale de la protéine et donc capable de reconnaître les deux formes de la protéine, nous avons constaté que la protéine détectée chez les mutants présentait un poids moléculaire plus élevé que

celui de la protéine de type sauvage et que cette différence correspondrait bien à la séquence additionnelle de 117 acides aminés.

2.2.1.1 Fonctions et localisation de HR bmh

Nos expériences d'immunoprécipitation ont montré que la protéine mutante HR bmh conservait sa capacité à se lier physiquement à des partenaires connus de la forme sauvage, et notamment à la protéine VDR. Pourtant, les co-transfections de la protéine HR bmh avec des constructions géniques contenant un promoteur cible de la signalisation VDR/HR ont révélé l'incapacité de HR bmh à réprimer l'activité transcriptionnelle des gènes rapporteurs utilisés dans les essais. De manière intéressante, malgré la présence de domaines d'interaction avec VDR intacts et des motifs de répression identiques, la protéine mutante n'était pas capable de se comporter comme la forme sauvage dans l'ensemble de ses fonctions. Cette différence dans l'activité des deux protéines Hairless, nous a poussé à étudier la localisation sub-cellulaire de HR bmh. Nous avons réalisé des transfection des vecteurs d'expression de ces protéines marquées avec les épitopes HA et Flag, dans plusieurs lignées cellulaires, afin de suivre leur répartition dans les compartiments cellulaires. Nous avons pu constater que, contrairement à la protéine sauvage HR qui est nucléaire, la forme mutante HR bmh avait une localisation cytoplasmique et ceci dans tous les types cellulaires transfectés. Son incapacité à réprimer la transcription serait donc une conséquence directe d'une localisation anormale, malgré le fait qu'elle ait correctement conservé l'ensemble et l'intégrité de ces domaines fonctionnels. De même, la protéine HR bmh qui se délocalise dans le cytoplasme n'est pas capable de transloquer le récepteur nucléaire VDR en dehors du noyau et de le séquestrer dans les compartiments cytoplasmiques.

Nous avons confirmé ces résultats dans des expériences d'immunofluorescence sur des coupes congelées de peau aux stades anagène et catagène de la première pousse des poils. En effet, à la différence de ce que l'on observe dans le follicule pileux normal, la protéine HR bmh est détectée dans le cytoplasme des cellules de la gaine externe des utricules chez les souris mutantes. Selon un premier scénario, la perte de fonction et le phénotype caractéristique des mutants bmh serait due à l'absence d'une protéine Hairless correcte dans les complexes multi-protéiques nucléaires. Ce sont ces complexes qui gouvernent la transcription en aval dans les cascades d'interaction géniques requises pour la formation et le contrôle du cycle du poil. La piste d'analyses que nous avons donc poursuivie dans la troisième partie de la thèse était d'identifier les possibles partenaires cytoplasmiques de la protéine HR bmh, ainsi que les voies de signalisation, traitement et dégradation dans lesquels ce produit aberrant pouvait être impliqué.

Article publié

L'ensemble de ce travail a été publié dans *Journal of Investigative Dermatology* en juillet 2007.

The “Bald Mill Hill” Mutation in the Mouse Is Associated with an Abnormal, Mislocalized HR bmh Protein

Maud-Virginie Brancaz-Bouvier^{1,2,3}, Eric J.G. Folco^{1,3}, Dimitri Salameire¹, Yannick Romero^{1,4}, Rabah Iratni^{1,5} and Stefan Nonchev^{1,5}

We have previously identified a mutation in the mouse hairless locus—hairless rhino bald Mill Hill (*HR^{rhbmh}*). The genetic alteration in these mice consists in a large 296bp deletion at the 3' part of the *hairless* gene (ID:MG1:3039558; J:89321). Here, we show that this deletion removes the stop codon and creates a new reading frame at the C terminus of the hairless protein, generating a larger mutant protein harboring an additional sequence of 117 amino acids. The mutant *hairless* gene mRNA is expressed during the embryonic and post-natal development of the hair follicle. The mutant protein is identified in bmh mouse skin at different stages of development by a specific antibody. We demonstrate that the HR bmh protein is able to interact with the vitamin D receptor (VDR), but is not able to repress VDR-mediated transactivation. Immunofluorescence analysis reveals that HR bmh protein displays an abnormal cellular localization in transfected cell lines, as well as in the epidermis and hair follicle of bmh mutant mice. We discuss the relevance of the hairless protein mislocalization in cell signalling pathways and with respect to the specific skin phenotype of mouse hairless mutants.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 26 July 2007; doi:10.1038/sj.jid.5700998

INTRODUCTION

The *hairless* gene in mammals encodes a nuclear factor that is highly expressed in skin and appears to control hair follicle integrity and cycling (Panteleyev *et al.*, 1998b). The *hairless* gene function is required for correct transition from hair follicle morphogenesis to entry in and maintenance of the hair cycle all along the life of a mammal. In the absence of a normal and functional Hairless protein, the hair bulb undergoes premature apoptosis during the first catagen stage of the hair cycle. The most striking effects of the mutation are loss of hair follicles and formation of epidermal utricles and dermal cysts (Panteleyev *et al.*, 1998c). The *hairless* gene expression appears to be widespread and temporally regulated. In wild-

type mice, hairless mRNAs were detected in skin, brain, cartilage, gonads, thymus, and colon (Cachon-Gonzalez *et al.*, 1999). In addition to alopecia, hairless mice strains show subtle defects in the development and differentiation of various tissues and organs (Panteleyev *et al.*, 1998a; San Jose *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005).

The HR protein is localized in cell nuclei and functions as a transcriptional regulator. Although its role has not been resolved in molecular terms, it was demonstrated that HR is able to behave as a corepressor for nuclear receptors (Potter *et al.*, 2001). HR seems to be a part of a large multiprotein complex, able to repress transcription by its association to chromatin remodelling factors such as histone deacetylases (Djabali *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2001, 2002). In particular, recent experimental data suggest that HR binds directly to the vitamin D receptor (VDR) (Hsieh *et al.*, 2003) and that *HR* gene overexpression is able to repress vitamin D-stimulated transcriptional activity in cultured cell lines including human keratinocytes (Hsieh *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006). Indeed, the phenotype of hairless mutant mice is comparable to that of VDR-null animals and human patients with mutations in the VDR gene, where hair development occurs normally, but the hair cycle is blocked at the first catagen stage (Li *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2001). Recently, it has been shown that HR repressor, by its ability to bind to and repress VDR action, is a key player in the sequential regulation of keratinocyte differentiation by vitamin D (Bikle *et al.*, 2007). It has also been reported that HR might be involved in cell adhesion

¹Institut Albert Bonniot, INSERM U823, University Joseph Fourier, La Tronche, France

²Current address: ERYtech, Pharma, 60 avenue Rockefeller, Lyon 69008, France.

³These authors have contributed equally to this work.

⁴Current address: Department of Genetic Medicine and Development CMU, Geneva, Switzerland.

⁵Co-senior authors.

Correspondence: Professor Stefan Nonchev, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France.

E-mail: snonchev@ujf-grenoble.fr

Abbreviations: bmh, bald Mill Hill; HR bmh, hairless rhino bald Mill Hill; HDAC5, histone deacetylase 5; PBS, phosphate-buffered saline; VDR, vitamin D receptor

Received 13 September 2006; revised 10 May 2007; accepted 24 May 2007

modulation, *Hox* gene regulation, Wnt signalling, and establishment of hair follicle progenitor cell identity (Brancaz et al., 2004; Beaudoin et al., 2005; Thompson et al., 2006). At least in the skin, but probably in other organs, the HR repressor seems to be responsible for the timing of epithelial cell differentiation. We have recently identified a mutation in the mouse hairless locus—hairless rhino bald Mill Hill (*Hr^{rhbmh}*). The genetic alteration in these mice consists in a large 296 bp deletion at the 3' part of exon 19 of the hairless gene (ID:MGI:3039558; J:89321) (Brancaz et al., 2004). In this paper, we show that this deletion removes the stop codon and creates a new reading frame of the hairless protein, generating a mutant product, HR *bmh*, harboring an additional sequence of 117 amino acids at its C-terminal end. This higher molecular weight protein is present in the embryo and at different stages of post-natal development. We show that the mutant *bmh* protein can interact with the VDR but is not able to repress VDR-mediated transcriptional activity. In contrast to its wild-type counterpart, HR *bmh* is mislocalized in the cytoplasm of transfected cell lines and epidermal and hair follicle cell populations. Our data contribute to refine current views on Hairless protein function in the molecular interactions responsible to shape morphogenesis and cycling of the hair follicle.

RESULTS

The mutant hairless gene is transcribed during development of rhino *bmh* mice

The molecular alteration in the hairless locus of *bmh* mutants consists in a 296-base-pair deletion at the 3' end of the gene. More precisely, this deletion removes the last 6 nucleotides of exon 19 and a large part of the hairless gene 3'-UTR (Brancaz et al., 2004; Figure 1a). This result allowed us to design specific primers for this part of the hairless locus and test the patterns of gene expression at different time points of epidermis and hair follicle development by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Such analysis is available for none of the dozen hairless alleles described to date in mice. Strikingly, the product of the *bmh* mutant locus was present at all stages of mid-embryonic to post-natal development. Figure 1b shows the RT-PCR product of the hairless gene expression in newborn mutants. The same bands of about 700 and 400 bp for the wild-type and mutant gene transcripts respectively were detected at embryonic day 15.5 (E15.5) and at post-partum day 10 (P10), P15, and P30 (data not shown). To validate the RT-PCR data, we investigated the tissue-specific hairless gene expression patterns in the mutants by non-radioactive RNA *in situ* hybridization. As shown in Figure 1c and d, the signals are

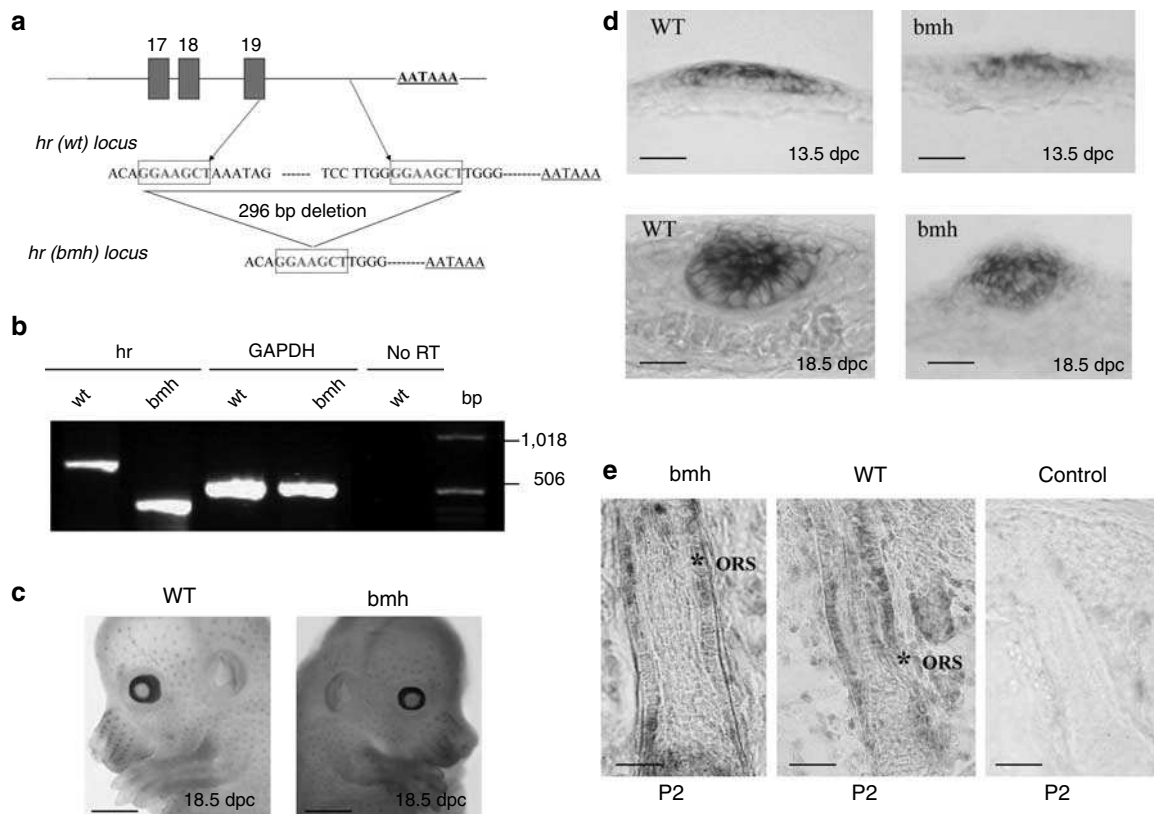


Figure 1. The hairless gene expression is unaffected in *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* mice. (a) Schematic representation showing the location of the deletion at the hairless locus of the *bmh* mice. The genomic region encompassing the previously described deletion (Brancaz et al., 2004) was amplified by PCR and the products were sequenced. (b) RT-PCR analysis of Hr gene expression in wild-type and mutant mice. (c) Whole-mount *in situ* hybridization of E18.5 wild-type and *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* embryos with hairless gene-specific DIG-labelled RNA probe. (d) Cryostat sections of embryonic whole-mounts at E13.5 and E18.5. (e) *In situ* hybridization of skin sections from *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* and *+/+* mice showing specific hairless gene expression in the cells of the outer root sheath of the hair follicle in mutant and wild-type mice at 2 days post-partum (P2). ORS = outer root sheath. Bars = 100 μ m.

localized in the hair placode at the very beginning of its morphogenesis in the mutant embryo as well as in its wild-type counterpart. Histological analysis of E13.5–E18.5 embryos confirms the specificity of *hairless* gene expression in the epidermal thickenings at the origin of the follicular placodes. In fact, this expression is restricted to the cells of the hair primordia and is not detected in the zone of the interfollicular epidermis (Figure 1d). Moreover, *hairless* transcripts persist in the cells of the outer root sheath of the hair follicle of newborn mice and in the utricles well after the establishment of fully blown hairless phenotype 3 weeks after birth (Figure 1e and data not shown). The expression of the *hairless* gene in the mutants is therefore not different from that of their wild-type counterparts. Sequence analysis of the mutant locus has shown that the polyadenylation signal of the *hairless* gene is not affected by the deletion. This observation correlates with the presence and detection of a mature RNA of the mutant allele. The correct spatial and temporal accumulation of the mutant transcript raised the question about its fate at the level of translation.

The HR *bmh* mutant protein is bigger than its wild-type counterpart

Having established that *hairless* gene transcription is not affected in *bmh* mice, we set out to investigate the effects of this deletion on the translation and the integrity of the protein product. Using the Bioedit software, we introduced deletion in the published sequence of the mouse *hairless* gene cDNA to examine the possible products of mRNA translation. Strikingly, the mutant protein designed by the software was longer than its wild-type counterpart. Comparison of the two sequences reveals the creation of a new open reading frame. In fact, this deletion—eliminating the last six nucleotides of exon 19 of the wild-type mRNA, as well as the stop codon and a substantial part of the 3′-UTR—leads to the synthesis of a protein characterized by the absence of the last two amino acids of the normal HR protein and containing an additional motif of 117 amino acids at the C′-terminal portion of the HR *bmh* protein (Figure 2b and c). To verify the existence of this mutant product *in vitro* and *in vivo*, we cloned both cDNAs in eukaryotic expression vectors (see Materials and Methods). We then tested the *in vitro* protein synthesis by incubating

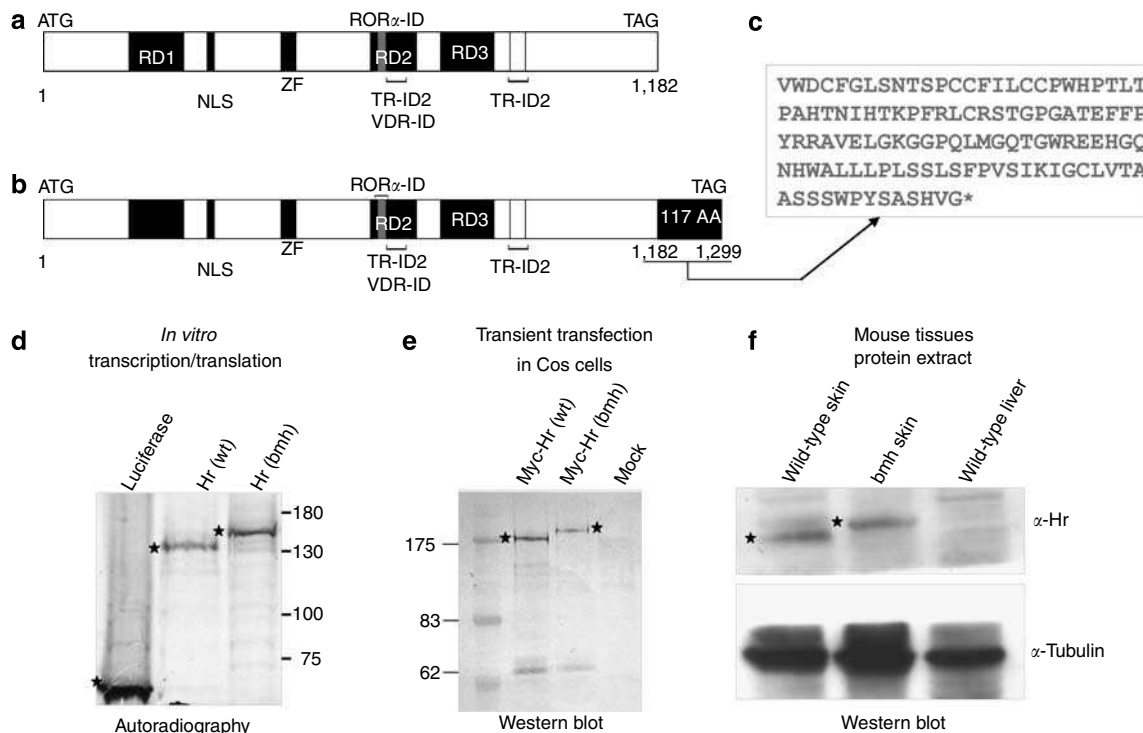


Figure 2. Deletion in the hairless gene results in loss of the termination codon and creation of a new reading frame coding for a supplementary 117-amino-acid sequence leading to a larger Hairless protein, HR *bmh*. (a) Schematic representation of wild-type Hairless protein. HR domains are defined as follows: repression domains (RD1, 2 and 3), RORα interaction domain (RORα ID), TR interaction domains (TR IDs), and VDR interaction domains (VDR IDs). The nuclear localization signal and the putative zing -inger domain are also indicated (see Nonchev *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006). (b) Schematic representation of the Hairless (*bmh*) protein. In addition to the functional domains present in the HR (wt) protein, the HR *bmh* protein contains a supplementary 117-amino-acid sequence (AS 117) at the C-terminus. (c) Amino-acid sequence of the C′-AS117. (d) *In vitro* transcription/translation of the Hr(wt) and Hr(*bmh*) cDNA. *In vitro* transcription/translation was carried out as described in Materials and Methods. (e) Wild-type and *bmh* Hr cDNA were Myc6-tagged and transiently transfected into Cos cells. Proteins were analyzed for the presence of HR(wt) and HR(*bmh*) by Western blotting. (f) HR(wt) and HR(*bmh*) detected by Western blot analysis with anti-HR-specific antisera in whole-cell protein extracts prepared from the skin of wild-type and *bmh* mice, respectively. Sizes of molecular mass markers (kDa) are indicated.

cloned cDNAs in rabbit reticulocytes transcription/translation system. The autoradiographs clearly show that *in vitro* translation of the wild-type cDNA results in the synthesis of a 130 kDa protein, which is approximately the size of the product expected for the wild-type HR protein. As anticipated, translation of the mutant cDNA generates a larger product of an apparent molecular weight of about 150 kDa, in adequacy with the putative presence of an additional sequence of 117 amino acids (Figure 2d). Then, we tested whether such HR mutant protein could well accumulate *in vivo*. To answer this question, Cos cells were transfected by vectors expressing Myc-tagged wild-type and *bmh* mutants cDNAs. The raw protein extracts of transfected cells were run on SDS-PAGE and the tagged proteins were revealed on Western blots by an anti-Myc antibody. As shown in Figure 2e, the mutant HR protein is well translated *in vivo* and presents a higher molecular weight than its normal counterpart. Finally, immunoblots of whole protein extracts from skins of $+/+$ and H^{rhhbmh}/H^{rhhbmh} mice at different embryonic and post-natal stages with anti-HR antibody confirmed that the higher molecular weight HR protein is produced specifically in skin development (Figure 2f). These data indicate that the 296 bp deletion at the hairless locus generates in homozygous *bmh* mice an HR protein whose functional properties and cellular localization are unknown.

The *bmh* mutant protein is still able to associate *in vivo* with the vitamin D receptor

Although the HR mutant protein is expressed *in vivo* and apparently conserves the integrity of all functional domains identified and described to date (see Figure 2b), the phenotype observed in *bmh* mice suggests that its function is impaired at least in epidermis and hair follicle development. To address the molecular nature of this deficiency, we started by analyzing its ability to interact with the VDR, which in the skin is a known partner of the wild-type HR protein (see Introduction). The fact that we were able to identify, clone, and translate the mutant *bmh* protein gave us molecular tools to explore further its functionality in cell culture experiments.

Whole-cell protein extracts from Cos cells co-transfected with Flag-tagged VDR and either wild-type hairless or *bmh* mutant Myc6x-tagged proteins were subjected to immunoprecipitation using a Flag antibody as described in Materials and Methods. Our immunoprecipitation results (Figure 3a) clearly show that the anti-Flag antibody, recognizing the fusion protein Flag VDR, is able to immunoprecipitate wild-type as well as *bmh* mutant HR proteins detected by Western blot using an anti-Myc antibody (Figure 3a, lanes 4 and 5, asterisks). No proteins were immunoprecipitated by the anti-Flag antibody when whole extracts from cells co-transfected with Flag and Myc empty vectors were used in the assay (Figure 3a, lane 6). These data strongly suggest that the fusion HR *bmh* co-immunoprecipitate and therefore can bind efficiently to its known VDR protein partner.

The *bmh* mutant protein is unable to repress VDR-mediated transactivation

The nuclear receptor corepressor HR associates with TR (Potter *et al.*, 2001), VDR (Hsieh *et al.*, 2003), and ROR (Moraitis *et al.*, 2002) in various cellular contexts, and has been shown to suppress VDR-mediated transactivation (Hsieh *et al.*, 2003). To tackle the repressor functions of the mutant *bmh* protein, Cos cells were co-transfected with the reporter plasmid Gal4-TK (thymidine kinase) luciferase along with hemagglutinin-VDR (HA-VDR)- and Gal4-RXR-expressing constructs in the presence of either HR wild type or HR *bmh*. Co-transfected cells were then cultured for 24 hours in the presence of vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) before measuring the luciferase activity. Our results show that wild-type HR protein represses efficiently ligand-stimulated VDR-mediated reporter expression, whereas HR *bmh* protein has no repressive effect on VDR-mediated transactivation (Figure 3b, compare transfections 6 and 7). The HR repression effect is VDR dependant, as both wild-type and mutant HR proteins do not affect reporter transcription when the VDR plasmid is omitted in the co-transfection assay (lanes 2–4). Taken together, these data illustrate a sharp loss in the repressive capacity of the mutant HR protein. This observation is quite unexpected, provided that HR repression domains involved in VDR interaction are not affected in hairless *bmh* mutant protein. To trace this loss of repressive function, we decided to look at the subcellular localization of the HR *bmh* mutant protein in a wide variety of cultured cell lines.

The HR *bmh* protein is mislocalized in the cytoplasm

The fact that the HR *bmh* protein was able to associate with VDR but failed to repress VDR-mediated transactivation is intriguing. This prompted us to investigate the cellular distribution of all these proteins in cell cultures. It is established that the wild-type Hairless protein is a nuclear protein and its localization is tightly associated to nuclear matrix-specific bodies (Thompson and Bottcher, 1997; Djabali *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2001). We therefore first tried to address the subcellular localization of the HR *bmh* protein. By cloning wild-type and mutant cDNAs in vectors tagged with the HA and the Flag epitopes, we generated expression constructs to transfect a variety of cell lines in culture. We then analyzed the expression and the localization of the mutant protein and its wild-type counterpart in these cell types by indirect immunofluorescence. Figure 4 shows that in all of the transfected lines the wild-type HR protein is nuclear, whereas the *bmh* mutant product is localized only in the cytoplasm and totally absent in the nuclei. As the transfection efficiency varies from line to line, at least 10–20 fields were analyzed for each construct and for every cell line. To confirm the authenticity of this protein mislocalization, in addition to the lines NIH3T3, 293, and Cos, we transfected mouse pituitary GHFT1 cells, mouse epidermal keratinocytes MCA-3D, and human epidermal keratinocytes HaCat. In all of the transfected lines, HR *bmh* protein was present in the cytoplasm. However, variations were observed in its cytoplasmic distribution pattern within the transfected lines. If in Figure 4 the mutant protein is

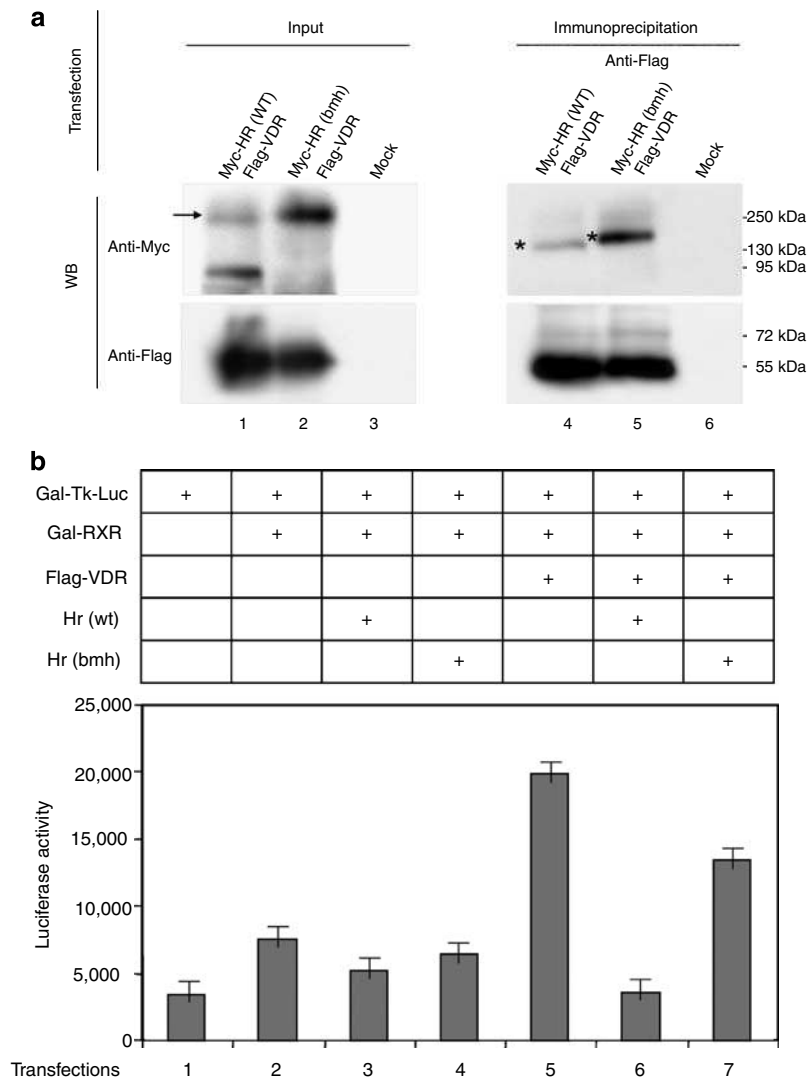


Figure 3. HR bmh binds to VDR, but is unable to repress VDR-mediated transactivation. (a) HR bmh co-immunoprecipitates with the nuclear receptor VDR in Cos cells. Co-immunoprecipitation experiment was carried out as described in Materials and Methods. Cos cells were transfected with HA-tagged VDR plasmid together with either Flag-tagged Hr(wt) or Flag-tagged Hr(bmh). Whole-cell extracts were immunoprecipitated with Flag antibody, subjected to Western blot analysis, and probed with anti-Flag and anti-HA antibodies. Input indicates that 1/10 of the whole-cell extract is used for immunoprecipitation. (b) HR bmh fails to repress VDR-mediated transactivation. Cos cells were transfected with Gal4-Tk-Luc reporter, Gal4-mRXR, HA-VDR, along with either Hr(wt) or Hr(bmh) expression plasmid, as indicated. Each transfection was carried out with a normalizing reporter, pRL encoding *Renilla* luciferase. The amount of expression plasmids was kept constant by balancing the total amount with empty vector. Quantification is from a representative experiment performed in duplicate.

evenly distributed in the cytoplasm, we found a high variability in the repartition of the bmh product in the cytoplasmic compartment of the transfected cells. Indeed, in some cases, strong staining was detected in a dense cytoplasmic mass with compact or more decondensed perinuclear localization, whereas in other cells the immunofluorescence was distributed in a punctuated way, localized in compact speckles of variable size all over the cytoplasmic area (data not shown). A rough estimation indicates that in about 10–20% of the cells analyzed, HR bmh protein expression is not uniform, but rather concentrated in discrete cytoplasmic regions. Considering that the nuclear localization signal is intact in the mutant HR bmh protein, this abnormal cytoplasmic localization is likely to be associated

with the presence of an additional sequence of 117 amino acids (C'-AS117). An exogenous nuclear localization signal, added at the N-terminus of the bmh mutant protein, was unable to target the protein in the nucleus (data not shown).

HR bmh is unable to sequester the VDR receptor in the cytoplasm

Next, we asked whether the association between HR bmh and VDR established in our immunoprecipitation experiment would affect the cellular distribution of these two proteins. HR bmh could well sequester the VDR in the cytoplasm, or in contrast, VDR would drag the mutant protein to the nucleus, which is less likely, as VDR is able to activate transcription despite the presence of the hairless mutant protein. Using the

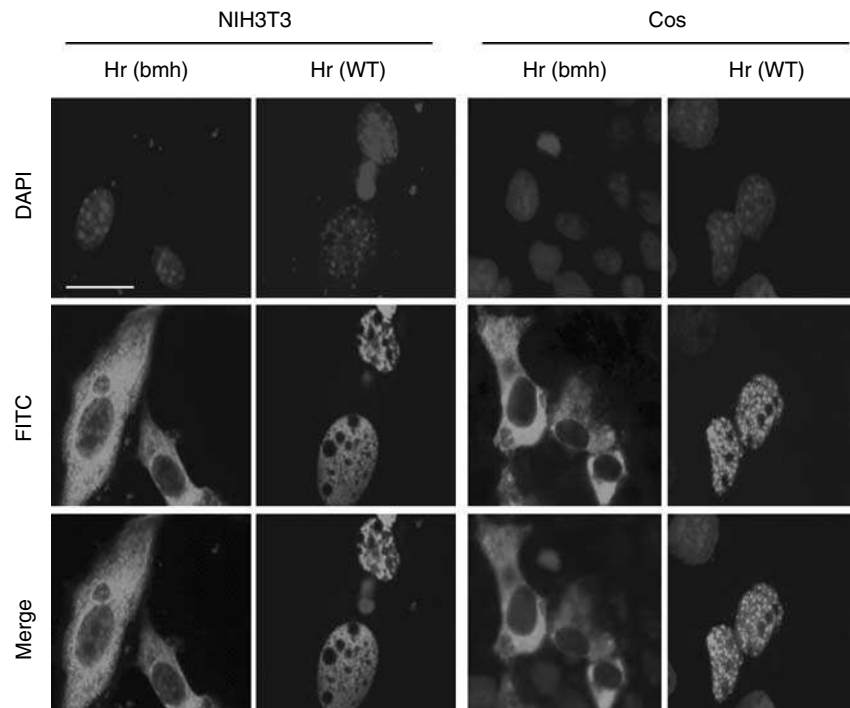


Figure 4. The additional 117-amino-acid sequence at the C-terminus (C'-AS117) abolishes HR bmh nuclear localization in mammalian cell lines. Flag-tagged Hr(wt) or Flag-tagged Hr(bmh) plasmids were transiently transfected into Cos and NIH3T3 cell lines. Subsequent to the transfection procedure (24–48 hours), cells were fixed and stained as outlined in Materials and Methods. Cells were viewed on an inverted fluorescence microscope using a magnification $\times 60$ objective.

reagents described above, we performed co-transfections of Cos cells by HR bmh—Flag and VDR-HA constructs. Figure 5 illustrates the separate localization of both proteins: VDR (in red) remains nuclear, whereas HR bmh (in green) is more or less uniformly distributed over large cytoplasmic regions. This result indicates that the binding capacities of these two proteins are not sufficient to modify their respective cellular localizations. To further validate these observations in a more physiological context, we decided to explore the *in situ* distribution of the HR bmh and VDR proteins in embryonic and adult epidermis and hair follicles of Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh} mutant mice.

The HR bmh protein is mislocalized in adult mutant skin

Immunohistochemistry experiments were first carried out on whole-mounts of E16.5 Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh} mouse embryos using our anti-HR antibody. At this stage, the hair peg is well defined with epidermal cells invaginating to form all the concentric structures of the future follicle with mesodermal condensations ready to shape the dermal papillae. As shown in Figure 6a, the HR bmh protein is well detected in the mutant embryos. However, the cellular resolution of our whole-mount immunostainings does not allow defining unequivocally the nuclear *versus* cytoplasmic distribution of the protein. In sagittal and transversal sections of whole-mount preparations, the protein seems to be localized at the periphery of the majority of cells forming the placode and the hair peg. However, in other cells of the same structures, the staining does not display a privileged subcellular localization

(Figure 6b). To compare the patterns of HR and VDR at this stage, we performed immunostaining with anti-VDR antibody used in cell transfection experiments. As with the anti-HR antibody, the analysis of whole-mounts and sections of VDR-stained embryos did not allow to discriminate nuclear *versus* cytoplasmic distribution at this stage (Figures 6e and f). To circumvent this lack of resolution, we studied both HR bmh and VDR localization in the adult mutant skin by immunostaining of frozen histological sections.

Histological sections of P21 Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh} mouse skins were probed with the anti-HR antibody and analyzed by immunofluorescence. Figure 6c and d shows a sagittal section of an utricle with the cells of the utricle epithelium where the cell nuclei and cytoplasm are clearly distinguished. In these sections, the anti-HR staining is detected mostly and with a much higher intensity in the cytoplasm of the utricle epithelial cells. Control longitudinal sections of full-size wild-type hair follicles clearly show nuclear localization of the HR protein in most of the cell layers surrounding the hair shaft (Figure 6i–n). We then performed immunohistochemical staining, using the anti-VDR antibody, of frozen sections at the same stage. It is interesting to note that specific nuclear staining was detected with this antibody. At high magnification, one can clearly see that the nuclei of cells forming the utricle (Figure 6g) and the interutricular epithelium (Figure 6h) display few zones or spots with strong immunoreactivity, reminding a nucleolar pattern of localization. These results confirm the observations in cell transfection experiments and suggest that the cytoplasmic

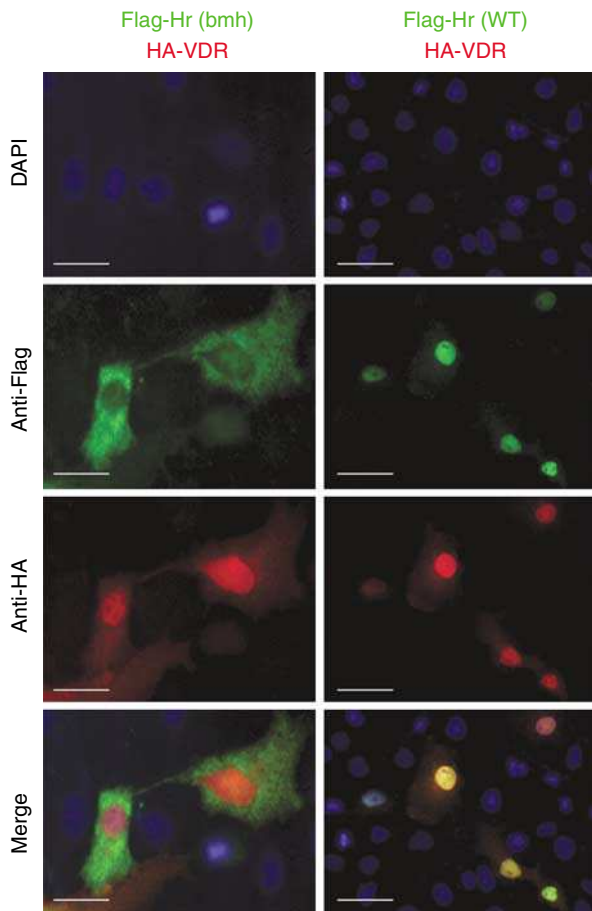


Figure 5. The cytoplasmic HR *bmh* protein has no influence on VDR nuclear localization. The results of immunofluorescence assay show Cos cells co-transfected with HA-tagged VDR together with Flag-tagged Hr(wt) (right) or Flag-tagged Hr(*bmh*) plasmid (left). After 48 hours, cells were processed with anti-Flag and anti-HA antibodies. HR wt colocalizes in the nucleus with VDR. HR *bmh* remains cytoplasmic, whereas VDR shows nuclear localization.

mislocalization of the HR mutant protein might be a primary event in the cascade of molecular interactions underlying the hairless *bmh* phenotype.

DISCUSSION

HR and VDR in anagen reinitiation

Unravelling the capacity of hair regrowth in molecular terms remains a challenge in skin biology. Among multiple candidates, *Hr* and *Vdr* genes seem to be particularly implicated in the control of hair cycle. Their mutant phenotypes specifically affecting this process have striking similarities, and the capacity of their protein products to physically interact is well documented (Li *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006). In a simple scenario, if the HR *bmh* mutant protein loses its nuclear localization, it would not be able to associate with VDR. However, the type of interaction between HR and VDR in the hair follicle remains to be elucidated. The HR *bmh* product is able to interact physically in transfected cells with the VDR. Despite the integrity of its RDs and VDR-IDs, it is neither able to repress ligand-dependant or ligand-independant VDR-mediated

reporter transcription, nor modify the VDR nuclear localization. In the case of the *bmh* mutants, the fine-tuning of these activities could be much more subtle as the availability of residual nuclear HR *bmh* could not be ruled out, and we know very little about its ability to transit between nucleus and cytoplasm. Very recently, it has been shown that *Hr* expression is boosted in *Vdr* null mice, indicating that HR might be acting downstream of VDR (Bikle *et al.*, 2006). Our immunostaining data confirm this observation in the sense that VDR is specifically expressed in the nuclei of *bmh* P21 utricles and epidermis, apparently in the absence of HR. It is tempting to speculate that in the hair follicle intense HR–VDR synergy is particularly required in the process of catagen–anagen transition for a balanced control of the cell proliferation machinery. However, a detailed exploration of the *Hr* gene regulatory regions for VDRE should be performed to shed more light on protein partnerships responsible to drive this interaction and confer spatial and temporal specificity of its effects on hair cycling.

Cytoplasmic HR in the temporal and spatial control of hair cycling

According to a current model based on transgenic rescue and knockout data, high expression of *Hr* in the nuclei of the ORS in early catagen represses Wnt signalling modulators like *Wise* and *Soggy*, which is crucial for correct differentiation of progenitor keratinocytes and entry (re-entry) in anagen (O'Shaughnessy *et al.*, 2004; Zarach *et al.*, 2004; Beaudoin *et al.*, 2005). Our data contribute to refine this concept of hair follicle differentiation and cycling. Indeed, the alteration in HR subcellular localization offers a tool to challenge and test the existing hypothesis about exactly how HR interferes with Wnt signalling. Monitoring *Wise* and *Soggy* expression and distribution in *bmh* mutants as compared to the *Hr* $-/-$ knockout mice would shed more light on the precise molecular way *Hr* represses Wnt signalling modulators. Transfections and gel shift experiments with the HR *bmh* protein would help to resolve the question of direct *versus* indirect implication of *Hr* in regulating Wnt modulators. Our previous data suggest that in mid-embryogenesis, *Hr^{rhbmh}* interferes with *Hox* gene regulation (Brancaz *et al.*, 2004). As some Wnts and the gene *Wise* itself are supposed to interact with *Hox* genes in various cell contexts (Itasaki *et al.*, 2003; Arata *et al.*, 2006; Nordstrom *et al.*, 2006), it is conceivable that different *Hr* mutations would help to reveal more factors in the cascades required for anagen re-initiation. On the other hand, *bmh* mutants are likely to be instrumental to tackle effectors and targets of the Wnt signalling in the cytoplasmic compartment, or to explore the perturbations in the outer root sheath (encompassing the bulge region) during the catagen phase of the first hair cycle. Our present data show that the HR *bmh* protein is cytoplasmic at this period of hair follicle (utricule) development. Using markers of HF stem cells, we have started analyzing the fate of the cell populations forming the bulge region in *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* mice. Our first results indicate that the formation of this territory is severely disrupted in *bmh* mutant mice (D. Salameire *et al.*, unpublished).

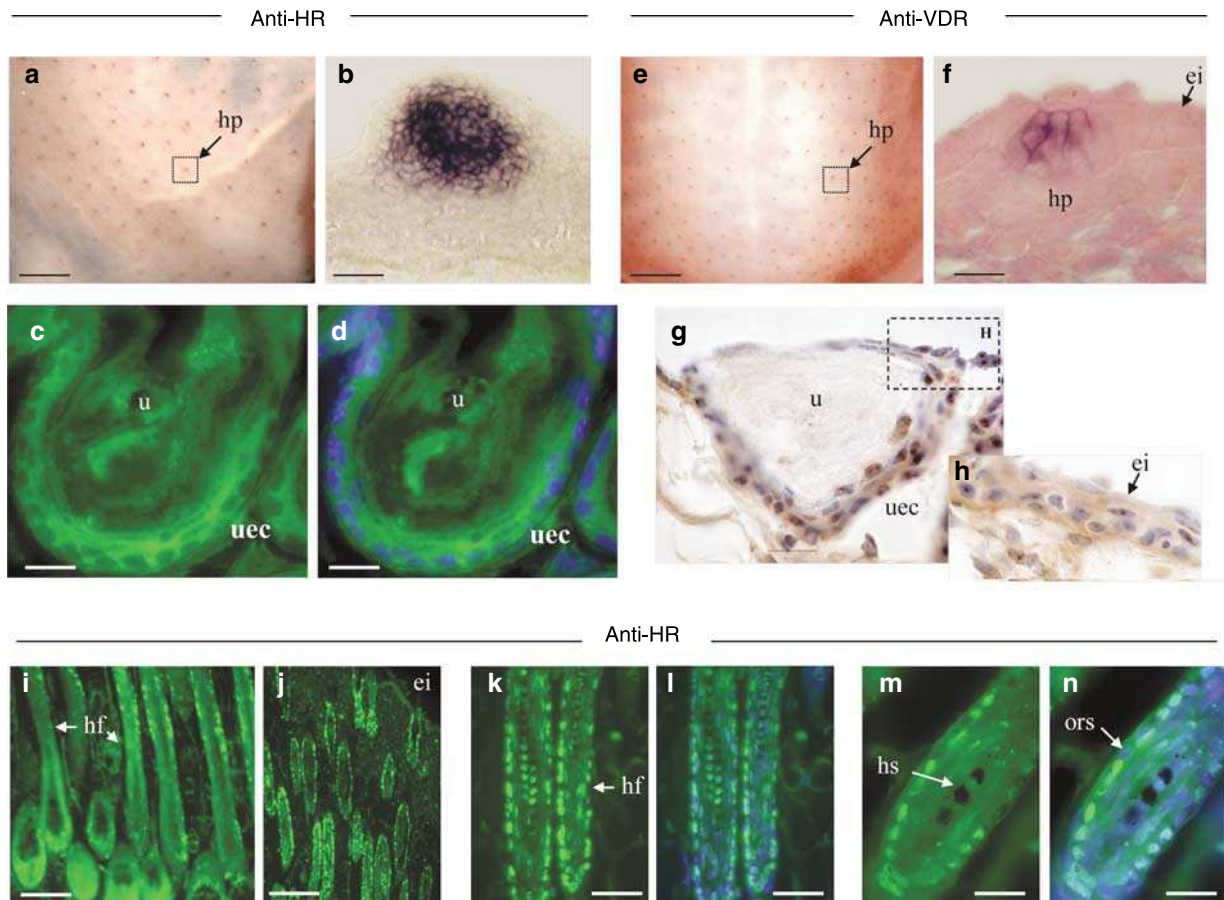


Figure 6. Immunostaining of the HR and VDR proteins in *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* embryos and adult mice. (a and e) HR (a) and VDR (e) proteins are detected in the hair pegs of E16.5 whole-mount immunostained mutant embryos. (b and f) Cross-sections through the hair pegs show that both HR and VDR are specifically expressed in the population of invaginating epidermal cells but not in the interfollicular epidermis. Note that (b) shows a section of optimal cutting temperature-embedded and frozen whole mount, whereas (f) is a section of paraffin-embedded whole mount. (c and d) At P21, HR protein is detected in the cytoplasm of the utricule epithelial cells in the skin of *Hr^{rhbmh}/Hr^{rhbmh}* mice. Note the strong staining of the cytoplasmic compartments in the majority of the utricule epithelial cells. Panel c illustrates FITC-conjugated anti-HR staining, whereas in (d) cell nuclei are visualized with Hoechst (Sigma). (g and h) VDR detection in the nuclei of utricule epithelial cells (g) and intertricular epidermis (h). Note the strong immunoreactivity in specific spots of the cell nuclei. (i-m) Longitudinal control sections of full-size hair follicles illustrating the nuclear localization of HR in wild-type mice. Abbreviations: hp = hair peg; u = utricule; uec = utricule epithelial cells; iue = intertricular epidermis; hf = hair follicle; ei = interfollicular epidermis; ors = outer root sheath; hs = hair shaft. Bars = 1 mm (a and e); 10 μm (b and f); 20 μm (i and j); 100 μm (c, d, g, k-n).

A function for mislocalized HR bmh?

The genetic alterations that have been identified to underlie most of the 13 allelic mutations reported to date at the mouse hairless locus include deletions, insertions, and point mutations supposed to abolish completely its expression, or assumed to affect specifically major functional domains of the protein (Bernard, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Nonchev *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006). Detailed analysis of a mutant *hairless* gene product is not available in the literature. We have started *in silico* and molecular studies to check if the additional 117-amino-acid sequence (C'-AS117) is responsible for HR bmh cytoplasmic localization. Till now, we have not been able to figure out a specific motif implicated in the cytoplasmic sequestration of the mutant HR bmh protein. It remains to be determined if and how the folding of the mutant HR bmh impairs the recognition of the nuclear localization signal and whether the C'-AS117 is involved in this process.

Potter *et al.* (2001) have shown that HR repressor activity might be due to its association in multiprotein complexes with histone deacetylases, in particular the class II histone deacetylase—histone deacetylase 5 (HDAC5) (Khochbin *et al.*, 2001). Interestingly, HDAC5 activity is known to be controlled by its intracellular localization. Indeed, its cytoplasmic sequestration is thought to make it unavailable for its nuclear partners (Yang and Gregoire, 2005). HR bmh could therefore be considered as an additional HDAC5-anchoring molecule that would affect the nuclear activities of HDAC5 by favoring its cytoplasmic retention.

A layer of complexity is added by the fact that HR protein harbors a characteristic JmjC domain, a motif conserved from yeast to human, which is a signature for a large family of histone demethylases (Takeuchi *et al.*, 2006). In the bmh mutants, the very C-terminal JmjC domain lies in continuity with the C'-AS117 motif described in this paper. Trapped in the cytoplasm, HR bmh, potentially able to associate with

deacetylases, could now modify complexes involved in histone demethylation and generate variable biological consequences as far as temporal and spatial gene regulation is concerned (Klose *et al.*, 2006).

In conclusion, we have identified, cloned, and characterized a mutant hairless protein that displays abnormal molecular anatomy and cellular mislocalization. Our results suggest that both *Hr* gene integrity and HR protein nuclear localization are required for the correct morphogenesis and cycling of the hair follicle. The study presents a description and analysis of a *hairless* gene mutant product. This is a precious tool to further unravel the genetic circuitry and the molecular partnerships underlying hair follicle cycling and specific skin pathology.

MATERIALS AND METHODS

Care of mice

The mutant *Hr^{hbmh}* allele has been maintained on a C57 BL/6J background for more than 20 generations in the mouse house of the Institute Albert Bonniot, Grenoble, France. The mice care and sample collection procedures were according to the guidelines of the French Comité d’Ethique. For skin whole-mount and histological analysis, embryos and mice were killed by cervical dislocation at different stages of embryogenesis and post-natal development.

Plasmid constructs

Mouse EST, clone image 3710814, containing *Hr* cDNA lacking 450bp from the 5' was purchased from MRC Gene Service (Cambridge, UK). The 5' missing sequence was amplified by 5' RACE experiment. Amplification product was inserted into the EST clone to generate full-length wild-type hairless cDNA. Full-length *bmh* cDNA was amplified by RT-PCR and the product was cloned into a TA cloning vector (Invitrogen, Paisly, UK). Full-length wild-type *Hr* and *bmh Hr* cDNA were subcloned into pCS2-Myc6x or pcDNA3-Flag expression vectors, and cDNA encoding the wild-type human VDR was subcloned into pcDNA3-Flag expression vector. The sequences of all clones were confirmed by sequencing. Plasmid encoding fusion protein Gal4-RXR was obtained from Hinrich Gronemeyer. Plasmids Gal4-TK-LUC and pRL (encoding *Renilla* luciferase) were obtained from Saadi Khochbin.

RT-PCR to detect Hr(wt) and Hr(bmh) transcripts

Total RNA was prepared from the skin of wild-type and *bmh* embryos and post-natal mice using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. For RT-PCR, first-strand cDNA was synthesized with SuperScript II RNase H-reverse transcriptase and the PCR was carried out with *Taq* polymerase (Qiagen, Courtabouf, France). Primer pairs that are specific for mouse hairless (forward (exon 17): 5'-GGCAGCTGCTACTTG GATGC; and reverse (3'-UTR): 5'-CCAGTAGACCTACAGAGTCGG) were used to generate a 737bp product for *Hr*(wt) and 441bp product for *Hr*(*bmh*). The mouse GAPDH primers were used to control the quality and the amount of the reverse-transcribed RNA.

Whole-mount embryos and skin *in situ* hybridization

To analyze *hairless* gene expression during development, whole-mount *in situ* hybridization with digoxigenin-labelled RNA probes

was performed on E13.5 and E18.5 embryos and skin samples of P2 and 3-week-old mice.

To generate *Hr*-specific probe, an EST fragment of 4.2 kb from the 3' end of the *hairless* gene was first subcloned in pBluscript KS+ (Stratagene, La Jolla, CA). The resulting plasmid was then linearized with *HindIII* or *NotI* to produce templates for sense and antisense probes, respectively. DIG-labelled cRNA probes were made as described (Xu and Wilkinson, 1998). The stained whole mounts were then embedded in optimal cutting temperature, frozen, serially sectioned with a cryotom, and the slides mounted in epox under coverslip. Skin from P2 and P21 post-natal mice were processed for *in situ* hybridization on 5 μ m sections as previously described (Wilkinson and Nieto, 1993).

Transcription-translation *in vitro*

Transcription-translation was performed *in vitro* using the Promega TNT Reticulocyte Lysate System according to the manufacturer’s recommendations. Comparable amounts of wild-type and mutant proteins were analyzed by SDS-PAGE by monitoring the incorporation of [³⁵S] methionine.

Antibodies

The polyclonal rabbit anti-HR antibody was generated in rabbits against a peptide that contains amino acids 1–200 of the mouse HR protein (Figure S2). It was made by the company Covalab (Lyon, France) and purified by affinity chromatography in our laboratory. Other antibodies used in this study are the mouse monoclonal M2 anti-Flag (Sigma, Chesnes, France), the rat monoclonal 3F10 anti-HA (Roche, Meylan, France), monoclonal 9E10 anti-Myc (Roche), and anti-VDR (BIOMOL, Plymouth, MA).

Preparation of skin proteins

Freshly harvested whole skin from wild-type and *bmh* mice was minced and homogenized in RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.25% sodium deoxycholate, 0.25% SDS, 1mM EGTA, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitors). Tissues were homogenized by repeated passing through a syringe needle and then incubated on ice for 1 hour. Debris was removed by centrifugation and the tissue extracts were analyzed by Western blot.

Cell culture and transfection experiments

Cos, NIH3T3, and 293 cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin. Cells were transfected with Superfect transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. Mouse pituitary GHFT1 and mouse epidermal keratinocyte MCA3D (a gift from Dr A Nieto) cells were grown in DMEM, high glucose (4.5g/l), and Ham’s F12 medium, respectively, supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin. Transfections of these cell lines were performed by the calcium phosphate precipitation method.

Co-immunoprecipitation assays and Western blot analysis

Cos cells were transfected as described above with 5 μ g of expression vector encoding Myc6x-tagged wild-type and *bmh hairless* gene constructs, and 3 μ g of expression vector for HA-tagged-hVDR per 10 cm dish. Cells, 48 hours after transfection, were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed

in immunoprecipitation buffer (10% glycerol, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitors). Protein estimation of cell lysates was determined using the Bradford reagent 5Bio-Rad. An equal amount of cellular proteins was immunoprecipitated with monoclonal anti-Flag antibodies crosslinked to protein G agarose beads (Sigma) at 4°C overnight. The beads were then washed, the bound proteins eluted with 0.1 M glycine buffer, pH 2.5, and separated by SDS-PAGE followed by transfer onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) and incubated for 2 hours with mouse mAbs against either the Flag or Myc epitope. The membranes were washed three times for 10 minutes each with Tris-buffered saline Tween and then probed with secondary (anti-mouse and anti-rat horseradish peroxidase-conjugated) antibodies, washed again with TBST, and developed with ECL Western blotting detection system (Pharmacia Biotech Inc.).

Luciferase assays

Cos cells were transfected in duplicate on 12-well plates (2×10^6 cells/well) as described above. Each transfection mixture included 500 ng of pRL reporter construct (for expression of *Renilla* luciferase), normalization control (Promega, Lyon, France), 250 ng of reporter plasmid (Gal4-TK-Luc), 250 ng of pSG4-mRXR (for expression of Gal4 mRXR), 250 ng of pcDNA3-HA-VDR (for expression of VDR-HA fusion protein), and 250 ng of either pCMV-Flag-Hr(wt) (for expression of wild-type HR) or pCMV-Flag-Hr(bmh) (for expression of HR bmh protein). The cells were cultured in the presence or absence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ as indicated in the figure legend and then harvested 48 hours post-transfection. The luciferase reporter assays were performed according to the manufacturer's instructions (Promega).

Immunofluorescent analysis in cell cultures

Cells were plated onto a two-wells (2×10^5 cells/well) labteck chamber slide (Nalgen Nunc International). Cells were transiently transfected with plasmid constructs as described above. Two days after transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes. The cells were then washed three times with cold PBS and permeabilized for 5 minutes with cold PBS containing 0.2% Triton X-100. Permeabilized cells were then washed three times with PBS and blocked for 30 minutes in PBS containing 5% non-fat dried milk before incubation with primary antibodies for 1 hour at 37°C in PBS containing 1% non-fat dried milk. After three washes with PBS, cells were incubated with secondary antibodies at 37°C for 30 minutes before being washed with PBS and stained with 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride in PBS. Cells were washed once again with PBS and then mounted in fluorescent mounting medium (DAKO, Trappes, France) before being observed under an epifluorescence Zeiss Axiophot microscope.

Whole-mount immunostaining of E16.5 embryos

After dissection, E16.5 embryos were fixed in 4% cold paraformaldehyde overnight, washed in PBT (PBS plus 1% Triton-X-100) then in PBTB (PBT plus 2 mg/ml of BSA), blocked for 2 hours in 10% fetal calf serum in PBTB and incubated in primary antibody diluted in PBTB with 10% fetal calf serum (1/300 dilution for anti-HR and

1/500 dilution for anti-VDR) for 8 hours or overnight. The embryos were then washed thoroughly in PBTB at 4°C, incubated with alkaline phosphatase-labelled secondary antibody, washed, and developed for 10–30 minutes in an NBT-BCIP-Levamisole solution. The stained embryos were embedded in optimal cutting temperature or paraffin, sectioned at 10 μm , and mounted under coverslip.

Immunofluorescent and immunohistochemistry analysis of P21 frozen skin sections

For immunofluorescence, frozen sections of dorsal skin from P21 mutant and wild-type mice were refixed in 5% paraformaldehyde overnight, then incubated in blocking solution and permeabilized in a hypotonic 10 mM sodium citrate solution. The slides were then incubated with primary anti-HR antibody (1/200), washed three times in dilution buffer, and incubated in an FITC-conjugated secondary antibody (anti-rabbit Alexa 488). After washing, the slides were counterstained in Hoechst, mounted under cover slip and observed under an epifluorescence Zeiss Axiophot microscope. For immunohistochemistry, the frozen sections were refixed in cold acetone, incubated in 0.5% hydrogen peroxide to quench endogenous peroxidase activity, antigen-retrieved by heating in a microwave in citrate buffer, and blocked in 1% BSA at room temperature. The sections were then incubated with primary anti-VDR antibody (BIOMOL), washed, covered by the peroxidase-coupled streptavidin/biotin complex (Dakopatts) and revealed by the DAB reagent. The slides were counterstained with hematoxylin and mounted under coverslips.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Henry Gronmayer for supplying the VDR and RXR plasmid constructs, Dr Angela Nieto for the mouse and human keratinocyte cell lines, and Drs Daniel Bikle, Yuko Oda, and Leonard Freedman for the VDRE reporter plasmids. This work was supported by the “Emergence” grant of the Region Rhône-Alpes and by the French Fondation de la Recherche Médicale (S.N.). M.-V.B. and E.F. had a PhD fellowship of the French Ministry of National Education. We appreciate helpful discussion with Stefan Dimitrov and Saadi Khochbin. We are grateful to Martine Le Pipec for an excellent mice care and to Brigitte Peyrusse for skillful artwork. A special thanks goes to Drs John Sundberg and Robb Krumlauf for their generous encouragement and suggestions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Coexpression of both wild-type and mutant HR has no effect on their respective localization.

Figure S2. Design, purification, and characterization of the anti-HR antibody.

REFERENCES

- Arata Y, Kouike H, Zhang Y, Herman MA, Okano H, Sawa H (2006) Wnt signaling and a Hox protein cooperatively regulate *psa-3/Meis* to determine daughter cell fate after asymmetric cell division in *C. elegans*. *Dev Cell* 11:105–15
- Beaudoin GMJ III, Sisk JM, Coulombe PA, Thompson CC (2005) Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14653–8
- Bernard BA (2002) Hairless and genetic disorders of hair. *Med. Sci.* 18: 276–80
- Bikle D, Teichert A, Hawker N, Xie Z, Oda Y (2007) Sequential regulation of keratinocyte differentiation by $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR, and its coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:396–404

- Bikle DD, Elalieh H, Chang S, Xie Z, Sundberg JP (2006) Development and progression of alopecia in the vitamin D receptor null mouse. *J Cell Physiol* 207:340–53
- Brancaz MV, Iratni R, Morrison A, Mancini SJ, Marche P, Sundberg J *et al.* (2004) A new allele of the mouse hairless gene interferes with Hox/LacZ transgene regulation in hair follicle primordia. *Exp Mol Pathol* 76:173–81
- Cachon-Gonzalez MB, San-Jose I, Cano A, Vega JA, Garcia N, Freeman T *et al.* (1999) The hairless gene of the mouse: relationship of phenotypic effects with expression profile and genotype. *Dev Dyn* 216:113–26
- Djabali K, Aita VM, Christiano AM (2001) Hairless is translocated to the nucleus via a novel bipartite nuclear localization signal and is associated with the nuclear matrix. *J Cell Sci* 114:367–76
- Hsieh JC, Sisk JM, Jurutka PW, Haussler CA, Slater SA, Haussler MR *et al.* (2003) Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem* 278:38665–74
- Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC *et al.* (2003) Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 130:4295–305
- Khochbin S, Verdel A, Lemerrier C, Seigneurin-Berny D (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11:162–6
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y (2006) JmJC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7:715–27
- Li YC, Pirro AE, Amling M, Dellling G, Baron R, Bronson R *et al.* (1997) Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9831–5
- Miller J, Djabali K, Chen T, Liu Y, Ioffreda M, Lyle S *et al.* (2001) Atrichia caused by mutations in the vitamin D receptor gene is a phenocopy of generalized atrichia caused by mutations in the hairless gene. *J Invest Dermatol* 117:612–7
- Moraitis AN, Giguere V, Thompson CC (2002) Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 22:6831–41
- Nonchev S, Brancaz MV, Folco E, Romero Y, Iratni R (2006) [The mouse hairless gene: its function in hair root and at the heart of a subtle pleiotropy]. *Med Sci (Paris)* 22:525–30
- Nordstrom U, Maier E, Jessell TM, Edlund T (2006) An early role for Wnt signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PLoS Biol* 4:e252
- O'Shaughnessy RF, Yeo W, Gautier J, Jahoda CA, Christiano AM (2004) The WNT signalling modulator, wise, is expressed in an interaction-dependent manner during hair-follicle cycling. *J Invest Dermatol* 123:613–21
- Panteleyev AA, Ahmad W, Malashenko AM, Ignatieva EL, Paus R, Sundberg JP *et al.* (1998a) Molecular basis for the rhino Yurlovo (hr(rhY)) phenotype: severe skin abnormalities and female reproductive defects associated with an insertion in the hairless gene. *Exp Dermatol* 7:281–8
- Panteleyev AA, Paus R, Ahmad W, Sundberg JP, Christiano AM (1998b) Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans. *Exp Dermatol* 7:249–67
- Panteleyev AA, van der Veen C, Rosenbach T, Muller-Rover S, Sokolov VE, Paus R (1998c) Towards defining the pathogenesis of the hairless phenotype. *J Invest Dermatol* 110:902–7
- Potter GB, Beaudoin GM III, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC (2001) The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 15:2687–701
- Potter GB, Zarach JM, Sisk JM, Thompson CC (2002) The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol* 16:2547–60
- San Jose I, Garcia-Suarez O, Hannestad J, Cabo R, Gauna L, Represa J *et al.* (2001) The thymus of the hairless rhino-j (hr/rh-j) mice. *J Anat* 198:399–406
- Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T, Kondo S (2006) Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* 235:2449–59
- Thompson CC, Bottcher MC (1997) The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8527–32
- Thompson CC, Sisk JM, Beaudoin GM III (2006) Hairless and Wnt signaling: allies in epithelial stem cell differentiation. *Cell Cycle* 17:1913–7
- Wilkinson DG, Nieto MA (1993) Detection of messenger RNA by *in situ* hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225:361–73
- Xie Z, Chang S, Oda Y, Bikle DD (2006) Hairless suppresses vitamin D receptor transactivation in human keratinocytes. *Endocrinology* 147:314–23
- Xu L, Wilkinson D (1998) *In situ* hybridisation of mRNA with hapten labelled probes. In: *In Situ Hybridisation: A Practical Approach* (Wilkinson DG, ed, 2nd ed), Oxford University Press: Oxford, UK, 87–106
- Yang XJ, Gregoire S (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25:2873–84
- Zarach JM, Beaudoin GM III, Coulombe PA, Thompson CC (2004) The co-repressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin. *Development* 131:4189–200
- Zhang J, Fang S, Wang CY (2005) A novel nonsense mutation and polymorphisms in mouse hairless gene. *J Invest Dermatol* 124:1200–5

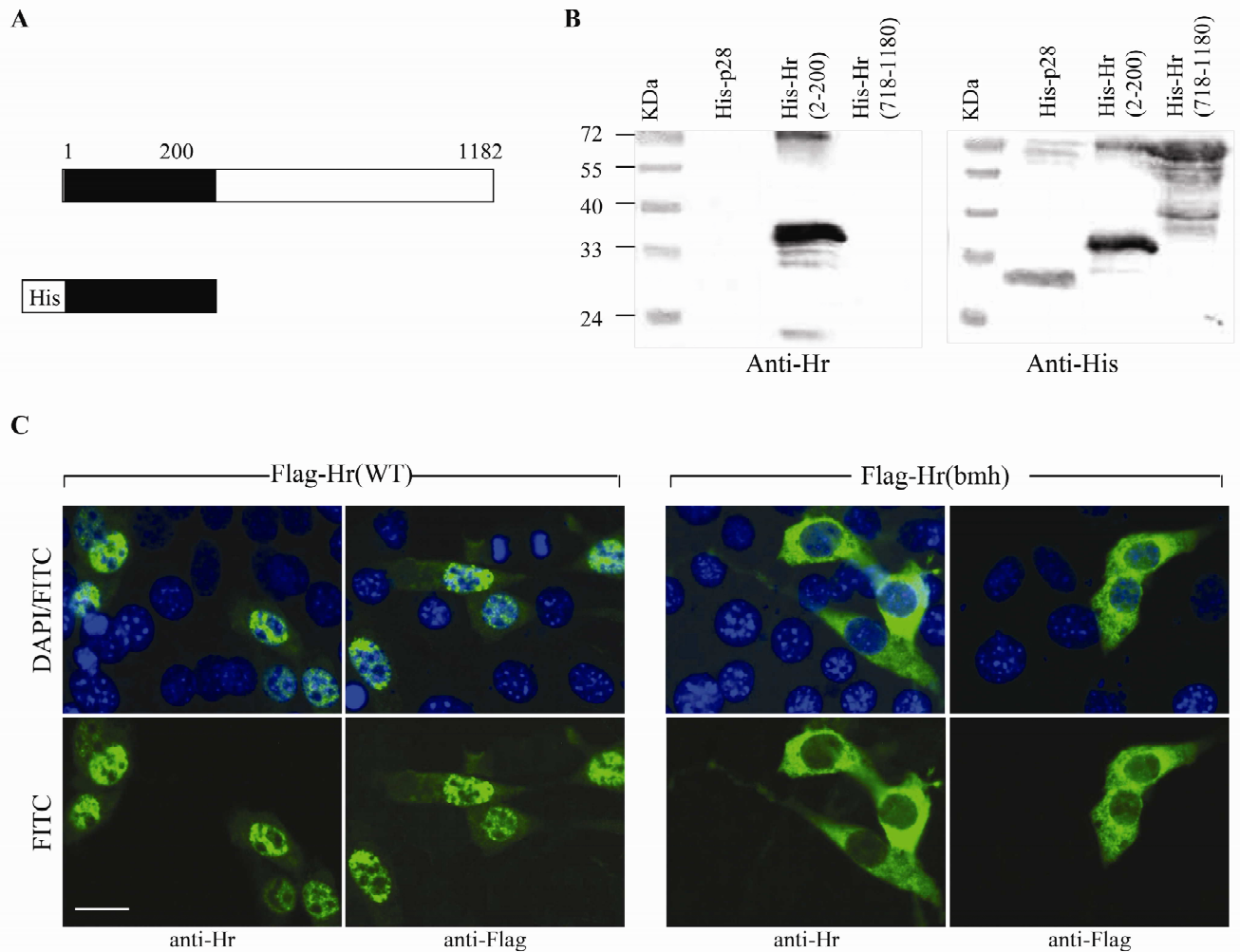


FIGURE 2.1 – Supplemental figure 1 - Design, purification and characterisation of the anti-HR antibody

A. Histidine tagged HR peptide (amino acids 2-200) was injected into a rabbit to generate anti-HR antibodies. Sera were collected and the HR antibody was affinity purified using the same peptide. Purified antibody was dialysed against PBS and stored at -80°C. Antibody specificity was tested by Western blot (B) and immunofluorescence (C). B. Two histidine tagged HR peptides (amino acids 2-200 and amino acids 718-1180), as well as histidine tagged transcriptional corepressor p28 were used to test the specificity of the anti-HR antibody. The anti-HR antibody recognizes the specific HR peptide (aa 2-200), but fails to detect the non specific peptide (aa 718-1180) or the p28 protein (left). The same proteins were revealed by the anti-Histidine antibody (right). C. Transfected wild type and mutant HR proteins can both be recognized by the antibody in an immunofluorescence assay.

2.3 Publication n° 3

2.3.1 La protéine anormale HR bmh est associée à des protéines cytoplasmiques

Comme nous venons de le voir, la protéine HR bmh se délocalise dans le cytoplasme. L'étape suivante de mon travail de thèse consistait à décrypter les modalités et les mécanismes de cette séquestration dans les compartiments extra-nucléaires.

2.3.1.1 Localisation cytoplasmique hétérogène de la protéine HR bmh

Pour mieux comprendre ce phénomène de localisation cytoplasmique particulière nous avons, dans un premier temps, procédé à des expériences de co-expression de HR et HR bmh. Tout d'abord nous avons voulu confirmer et étendre cette observation. Pour exprimer les deux protéines dans la même cellule, nous les avons étiquetées avec les épitopes HA et Flag puis co-transfectées transitoirement dans des cellules Cos. Nous avons constaté que les deux protéines restaient bien dans leurs compartiments respectifs. Pour éliminer l'effet éventuel de l'étiquette HA ou Flag, nous avons échangé ces épitopes entre les deux constructions. La localisation nucléaire de la protéine Hairless, ainsi que la séquestration cytoplasmique de HR bmh ont été confirmées.

De façon intéressante, dans les expériences de détection du produit aberrant j'ai également observé des profils d'expressions hétérogènes dans environ 20% des cellules transfectées. Les patrons de cette hétérogénéité varient considérablement d'une cellule à l'autre. Ainsi, dans certaines cellules l'immunoréactivité est organisée en pointillé avec des granules plus fines ou plus denses, réparties sur l'ensemble du cytoplasme. Ces granules sont parfois très fins et entremêlés avec des fibres et fibrilles de densité et longueurs variables. Dans d'autres cellules des zones entièrement privées de protéine et plutôt apposées à la membrane nucléaire sont observées. Enfin, dans de rares cellules, des masses compactes de protéine de forme lobulaire plus ou moins régulière entourent le noyau sur la totalité de sa périphérie. Un des objectifs principaux dans cette dernière partie du travail de thèse était d'essayer d'élucider d'abord pourquoi Hr bmh reste séquestrée dans le cytoplasme et ensuite d'aborder la signification et l'authenticité de cette répartition particulière et variable.

2.3.1.2 Le motif surnuméraire ne semble pas jouer de rôle dans la séquestration

Une des premières pistes que nous avons suivies concernait l'étude du rôle du motif surnuméraire AS117 de la protéine HR bmh. Ce motif possède un signal putatif d'export nucléaire (NES). Nous avons tenté d'inactiver ce NES putatif par mutation ponctuelle ou de le supprimer par délétion sélective en gardant le reste de la protéine intacte. Nous avons constaté que ces nouvelles formes mutantes ne modifient pas la localisation cytoplasmique de la protéine HR bmh. Ce NES n'est donc pas responsable du maintien de la protéine dans le compartiment cytoplasmique. Nos expériences pour tester le rôle du repliement de la protéine mutante par l'ajout d'un nouveau signal de localisation nucléaire n'ont pas

donné des résultats concluant et j'ai finalement utilisé la séquence de 117 acides aminés pour réaliser des BLAST dans des banques de séquences protéique et éventuellement trouver des homologues qui pourraient nous éclairer sur la présence d'éventuels partenaires et circuits d'interaction. Il est à noter que le seul candidat identifié par le BLAST était une petite protéine du CMH de classe I, la $\beta 2$ microglobuline, impliquée dans l'adressage à la membrane plasmique. Cette molécule présentait bien une homologie de séquence sur plus de 15 acides aminés dans la partie centrale d'AS117. La séquence homologue n'était pas connue et répertoriée comme un motif fonctionnel ou de signalisation dans les banques de données. Cette découverte nous a pourtant poussé à nous poser la question de savoir si la protéine HR bmh se retrouvait dans le cytosol ou était associée aux structures cytoplasmiques membranaires.

2.3.1.3 La protéine HR bmh interagit avec la protéine HDAC6

Par une approche de candidat, j'ai tout d'abord envisagé la protéine cytosolique HDAC6 comme partenaire possible de HR bmh. Plusieurs éléments m'ont orienté dans cette direction. Il est connu que la protéine de type sauvage HR s'associe aux HDACs pour exercer son rôle de répresseur. De plus, des études *in silico* montrent que les séquences de la protéine Hairless présentent plus de 70% d'homologie avec la protéine HDAC6, une protéine qui a une localisation en grande partie cytoplasmique, et fait souvent la navette entre noyau et cytoplasme. Au niveau d'HDAC6 cette homologie de séquence se trouve sur toute la partie d'un domaine en position N-terminal, appelé DD1, dont nous étudions la fonctionnalité. Enfin, HDAC6 est une des protéines du cytosol qui se lie à l'ubiquitine et jouent par conséquent un rôle clé dans l'adressage des protéines au protéasome, pour dégradation et élimination.

Les résultats d'une analyse par immunoprécipitation suggèrent que HDAC6 est capable d'interagir physiquement avec HR bmh. Par la suite, notre analyse par immunofluorescence après co-transfection d'HDAC6 et de Hairless a révélé une forte co-localisation, aussi bien en microscopie à champ large que sur un microscope confocal. L'étude par délétions successives des divers domaines fonctionnels de HDAC6 a montré que son domaine DD1 était le seul motif responsable de la co-localisation entre ces deux protéines.

Enfin pour rendre compte de la présence d'agrégats et de granules de HR bmh dans le cytoplasme et afin d'explorer l'association possible de HR bmh avec les compartiments membranaires, nous avons essayé d'identifier les compartiments cytoplasmiques où cette protéine se localise. En utilisant des anticorps spécifiques nous avons montré que les endosomes tardifs et les lysosomes pouvait abriter HR bmh, alors que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes précoces ne semblait pas être des sites préférés pour sa séquestration. Cette voie de dégradation alternative est à prendre en considération en évoquant l'homologie avec la $\beta 2$ microglobuline.

L'ensemble de ces données est en faveur de l'idée que HR bmh pourrait soit être prise en charge par HDAC6 pour sa dégradation par ubiquitination, soit suivre la voie endosomiale. Les deux possibilités de-

vraient être explorées avec des réactifs et des approches plus appropriées pour établir un lien authentique entre la localisation subcellulaire de HR bmh et le phénotype cutané des mutants bald Mill Hill.

Article en préparation

L'ensemble de ce travail est actuellement en cours de finalisation. Il est présenté sur les pages qui suivent. J'ai réalisé personnellement les expériences décrites dans cet article à l'exception de l'étude du motif NES putatif et des premières immunofluorescences entre les deux formes de la protéine HR. J'ai également participé à la conception et à la réalisation du manuscrit.

The abnormal, mis-localized HR bmh protein associates with members of the protein processing machinery in the cytoplasm

Eric G. Folco¹, Maud-Virginie Brancaz-Bouvier, Agnès Belly and Stefan Nonchev^{1*}

¹Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Université Joseph Fourier, Site Santé – BP170, 38042 Grenoble Cedex 9 France

*correspondence to

Stefan Nonchev

¹Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Université Joseph Fourier, Site Santé – BP170, 38042 Grenoble Cedex 9 France

tel : 33 476 54 95 75 ; fax : 33 476 54 95 95

email : snonchev@ujf-grenoble.fr

key words : Hairless corepressor, cytoplasmic substructures, nuclear hormone receptors, proteasome, endosome processing

Abstract

We have recently mapped a 296 bp deletion at the mouse hairless locus that causes the mutation hairless rhino bald Mill Hill, (*Hr^{rhbmh}*), (ID:MGI:3039558; J:89321), removing the stop codon and generating a larger mutant protein HR bmh with an additional sequence of 117 amino acids. The mutant *hairless* gene mRNA is expressed during the embryonic and post-natal development of the hair follicle. A mutant HR protein was identified in bmh mouse skin at different stages of development by a specific antibody. We demonstrated that the HR bmh protein is able to interact with the vitamin D receptor, but is not able to repress VDR-mediated transactivation. Immunofluorescence analysis revealed that HR bmh protein displays an abnormal cellular localization in transfected cell lines, as well as in the epidermis and hair follicle of bmh mutant mice. Here we analyse the patterns of HR bmh extra-nuclear localization in cell transfection experiments. Using a candidate approach, double transfection experiments, immunofluorescent staining and IP protocols we established that HR bmh co-localizes specifically with the proteins HDAC6 in the cytoplasm is able to physically interact with it. Blast analysis allowed to show that HDAC6 and share high sequence homologies with specific motifs of HR bmh. We studied the association of these potential interactors with various cytoplasmic compartments. We discuss the relevance of the mutant hairless protein mis-localization in endosomal processing and in proteasome related pathways with respect to the specific skin phenotype of mouse hairless mutants.

Introduction

In Mammals the gene *hairless* (*Hr*) encodes a nuclear factor strongly expressed in skin and crucial in controlling hair follicle integrity and cycling. In the absence of a normal and functional Hairless protein, the hair bulb undergoes premature apoptosis linked to loss of hair follicles and formation of epidermal utricles and dermal cysts (1), (2), (3).

The HR protein is localised in cell nuclei, tightly associated to nuclear matrix specific bodies and functions as a transcriptional regulator. Although its role has not been entirely resolved in molecular terms, it was demonstrated that HR is a corepressor for nuclear hormone receptors, HR is a component of large multiprotein complexes able to repress transcription by its association to chromatin remodelling factors such as histone deacetylases (4), (5), (6), (7). The *Hr* gene function is involved in cell adhesion modulation, *Hox* gene regulation, Wnt-signalling, and establishment of hair follicle progenitor cells identity (8), (9), (10). In the skin, as well as in other organs, the HR repressor seems to be a factor in the process of epithelial stem cells migration and differentiation. As the hair follicle undergoes repeated cycles of growth and degradation, these dynamic changes require stark and coordinated regulation of gene expression. The HR protein nuclear localisation is a key factor thought to control hair cycle dependant downstream gene transcription. A number of molecules involved in the control of hair cycling, not only change their activities and levels of their expression at the transition between anagen – catagen and catagen – telogen stages of hair cycles, but also modify their subcellular localisation according to the dynamics of growth and regression (11), (12). Shuttling between nucleus and cytoplasm has been reported for several proteins as a mechanism by which gene expression is regulated within different cell populations and components of the follicle itself. Mutated proteins, unable to fulfil their correct function can be directed to cytoplasmic compartments and processed for degradation. The class II histone deacetylase HDAC6 is a molecule that retains its capacity to acetylate histones and other proteins and in the same time it is predominantly localised in the cytoplasm (13). It has been shown that this enzyme has the intriguing property to be capable of nucleocytoplasmic shuttling (14). In some cases HDAC6 can translocate to the nucleus but its function in the cytosol remains elusive. This molecule has been shown to play a part in the ubiquitin signalling pathway and be involved in the proteasome dependant protein degradation (15). Unlike other nuclear histone deacetylases (HDAC1, HDAC3 and HDAC5), HDAC6 has not been found responsible for the HR protein corepressor function (6).

We have recently described a novel hairless mutation in the mouse – hairless rhino bald Mill Hill, symbol (*Hr^{rhbmh}*) harbouring a large 296 bp deletion at the 3' part of exon 19 of the hairless gene (ID:MGI:3039558; J:89321), (9). We have shown that this deletion removes the stop codon, and creates a new reading frame of the hairless protein, generating a mutant product – HR bmh, encompassing an additional sequence of 117 amino acids at its C-terminal end (AS-117). This higher molecular weight protein is present in the embryo and at different stages of postnatal development. By contrast with its wild-type counterpart, HR bmh is mis-localised in the cytoplasm of transfected cell lines, epidermal and hair follicle cell populations (16).

Our present paper explores in more details the patterns of cytoplasmic localisation of HR bmh as well as its association with molecules involved in protein processing activities. We identify HDAC6 as a potential partner of the HR mutant protein.

Results:

Nuclear versus cytoplasmic Hairless protein localization

To generate expression constructs and address the subcellular localization of the HR bmh protein we have previously cloned wild type and bmh mutant cDNAs in vectors tagged with the HA and the Flag epitopes. By single transfections in a variety of cell lines, we have shown that wild-type HR protein is nuclear, while the HR bmh mutant product is localized only in the cytoplasm and absent in the nuclei (16). As a first step to confirm and extend this analysis, we have now performed double transfections in Cos cells to coexpress mutant and wild type proteins in the same cell. In addition, in order to minimize artefacts of transfection, we swapped the tags HA and Flag of both proteins in the series of coexpression experiments. To detect the proteins we used Rhodamin coupled secondary anti-HA antibody and FITC-linked secondary anti-Flag antibody (see Material and Methods). Figure 1 A to F shows double transfection of Cos cells by HA tagged HR bmh and Flag tagged wild-type HR. In cells transfected with both plasmids (Figure 1, A,B, C and D) the wild type HR protein is nuclear (green), while the HR bmh (Red) is localised in the cytoplasm. In cells where only one plasmid was transfected, again as previously shown, the normal protein is nuclear and its mutant counterpart – cytoplasmic (Figure 1, E and F). Using the opposite labelling, i.e., when wild type HR is marked by HA and mutant HR by Flag, we note the same clear subcellular separation of the two proteins. (Figure 1, G to I). These data confirm that independently of the labels used, in cell culture experiments the HR bmh protein displays a steady and reproducible localisation in the cytoplasmic compartment. As the transfection efficiency vary from line to line, at least 20 to 30 fields were analysed for each double transfection experiment. A careful examination of double transfection and coexpression experiments confirmed our previous observations suggesting that in about 20% of the transfected cells; the immunoreactivity was not uniform, but rather concentrated in discrete cytoplasmic regions (16). We then set out to explore in more detail the way HR bmh is expressed in transfected cells.

The HR bmh protein displays various patterns of cytoplasmic localization

The patterns of HR bmh irregular distribution are illustrated on Figure 2 A to I. The immunoreactivity is typically punctuated, localized in a number of compacts speckles with variable size either all over the cytoplasm, or confined in particular zones (Figure 2A, B and C). In these cells some areas are completely devoid of immunofluorescence (Figures 2A), while others display either filamentous or finely granulated staining (Figure 2B and C). The

high variability in the repartition of the HR bmh product in the cytoplasmic compartment of the transfected cells is also characterised by juxtaposed zones of intensely stained cytoplasm surrounding areas where the protein is not expressed (Figures 2D, E and F) These “bmh-less” territories often display a marked perinuclear localisation. (Figure 2E, G and H). In striking contrast with this pattern, in many transfected cells the HR bmh protein is organised in dense cytoplasmic masses compactly apposed to the nuclear membrane with extremely highly levels of immunofluorescent staining (Figure 2, I). Although this odd distribution of the protein could be due to transfection and/or overexpression artefacts, it was to be taken cautiously into consideration while we were looking for cytoplasmic partners of the HR bmh protein.

The C'-AS117 putative NES is not functional in transfection experiments

As mentioned above and reported previously, the mutant HR bmh protein harbours an additional sequence of 117 amino acids at its C-terminal end (16). The rest of the protein is identical to the wild type one, in particular, the nuclear localisation signal (NLS) is intact, although its function is apparently perturbed (Figure 3A). To understand why this aberrant product is miss-localised in the cell, we set out to determine the precise role of AS117 in the behaviour of HR bmh. Our first approach was to verify if the addition of 117 amino acids could alter the correct tri dimensional folding of the wild type protein and hinder the functioning of the NLS. To tackle this possibility, we created a fusion protein with the GAL-4-DBD, known for its exclusive nuclear localisation. Transfections of the fusion protein GAL-4-DBD-HR bmh in a number of cell lines resulted again to clear cytoplasmic localisation for the fusion product (data not shown). These observations suggested that motifs responsible for cytoplasmic sequestration should be looked for in the 117 amino acid fragment. Careful examination of AS-117 allowed to spot the presence of a short sequence - LLLPLSSLSF- strongly resembling to a leucine rich consensus motif LxxxLxxLxL, called nuclear export signal (NES) and known for its capacity to regulate the nucleo-cytoplasmic transport of many proteins. To test the function, we targeted the C-terminal putative nuclear export signal motif of AS117 by specific deletions and mutations (Figure 3A). We created two variants of cDNAs coding for a HR bmh protein where the motif of interest is either mutated or deleted. By site directed mutagenesis we generated the construct HR bmh L83A/L87A, where the lysines 1 and 4 of the motif have been replaced by arginine. In the construct HR bmh CΔ35 the motif of interest as well as the last 25 C-terminal amino acids were deleted (Figure 3A). These two cDNAs were cloned in Flag-tagged expression vector

and transfected in NIH 3T3 cells to analyse the effects of these mutations on the subcellular localisation of the HR bmh protein. As illustrated on Figure 3B, this experiment did not allow to define the precise element, responsible for the sequestration of the HR bmh protein. Neither the point mutation, nor the loss of the entire motif -LLLPLSSLSF- did modify the cytoplasmic localisation of the mutant Hairless protein. As the examination of the remaining N-terminal of the additional sequence does not contain putative sequences involved in a particular subcellular localisation, nor consensus sequences implicated in protein-protein interaction, we decided to perform a BLAST analysis in bank protein bank with C'-AS117 alone. Intriguingly, in the only hit of this BLAST, we found a strong homology between the central part of AS117 and a motif of the serum $\beta 2$ microglobulin (Figure 3C), which is a non glycosylated single chain protein present in light chain of HLA-class I complexes, known to stabilise the tertiary structure of associated partners and play a role in the protein trafficking as well as a prognostic value marker in renal diseases. This finding incited us to explore a possible involvement of the mutant HR protein in various pathways of cytoplasmic of protein processing.

The proteins HR bmh and HDAC6 co-localise in the cytoplasm after transient transfection

The wild type hairless protein associates in vivo preferentially to histone deacetylases 1, 3, 5 and is thought to function as a corepressor through direct or indirect interactions with HDACs (4), (17). The HR bmh exerts its effects either by the loss of function as a nuclear corepressor, or by specific involvement in proteins trafficking and degradation in the cytoplasm. Looking for a cytosolic candidate able mediate protein degradation, we concentrated our analysis on the cytoplasmic class II histone HDAC6, which is implicated in acetylation of cytoplasmic proteins and proteasome processing (15). We co-transfected Cos cells with constructs expressing HR bmh and HDAC6 and analysed their patterns of expression after transient transfection. Intriguingly; the Cos cells expressing both proteins display highly reproducible patterns of immunoreactivity characterized by a number of specific features (Figure 4A to I). HR bmh and HDAC6 co-localise in large cytoplasmic areas, which are not uniformly stained, but present homogeneous zones interspersed with dots and speckles expressing high levels of both proteins (Figure 4A to I). Besides, HDAC6 specific fluorescence is observed in parts of the cytoplasm of variable size and location (Figure 4A to I). HR bmh also present zones where it is expressed alone, but these are of restricted size and most often apposed to the nuclear membrane (Figure 4A to I). The patchwork of overlapping and independently

detected immunostaining raised the question of whether or not the HR bmh and HDAC6 can physically interact. To generate cytoplasmic extracts for immunoprecipitation experiments, we cotransfected NIH 3T3 cells with constructs expressing HA tagged Hairless wild type or mutant protein together with Flag epitope labelled HDAC6. The complexes were precipitated with anti-Flag antibody, the beads washed, and boiled before Western blot analysis with anti-HA antibody. As illustrated in Figure 4J, both wild type and bmh proteins immunoprecipitate with HDAC6 (Figure 4J, lanes 1 and 2). The specificity of this interaction was confirmed by the opposite combination of antibodies (data not shown) and a number of test transfections were used as controls (Figure 4J, lanes 3 to 7). These data were in favour of an involvement of HDAC6 in the processing of HR bmh and we wanted to know what part (s) of the HDAC6 molecule was implicated in the association and more importantly, which of its multiple functions was exposed to the interaction.

The DD1 domain of HDAC6 is required for association with the HR bmh

As a candidate for interaction with HR bmh, the HDAC6 presents several functional motifs that might offer different options for the specific type of protein-protein interaction. A series of deletion derivatives has been previously created to map the functionalities and the cellular localisation of the HDAC6 enzyme (13). We decided to take advantage of these tools and co-express each one of them together with the whole of HR bmh protein in transfected Cos cells. Thus Flag-tagged HR bmh and HA-tagged HDAC6 deletion derivatives were used and the expression of transfected proteins was now monitored by confocal microscopy (Figure 5A to R). The patterns of full length protein colocalisation confirm the results obtained by wide field microscopy. Indeed, as previously observed, the dots and speckles of co-localised immunoreactivity are interspersed with areas and nodules where each of the partners is independently and strongly expressed. (Figures 5A to C). Constructs encompassing the N-terminal portion of the HDAC6 and the deacetylation domain one (DD1) also drove enzyme expression in the cytoplasm and created patterns of co-localisation (Figure 5D to F). When the DD1 was tested alone the profiles of immunoreactivity were again marked by high levels of yellow staining in the merge of the pictures generated by the two antibodies (Figure 5G to I). Interestingly, with this later construct the colocalisation of HR bmh and HDAC6 is even more widespread than when the whole HDAC6 was transfected (compare Figure 5I and F to Figure 4C, F and I). By contrast, in the absence of DD1 the two transfected proteins did not co-localise at all (Figure 5J to R). When the deacetylation domain 2 (DD2) is used, HDAC6

displays a restricted expression in the nucleus (Figure 5J to K). If the same DD2 is linked to the C-terminal domain the expression is very weak and diffuse all over the cell (Figure 5M to O). Similar patterns of HDAC6 expression and absence of any co-localisation was established if only the C-terminal portion is cotransfected with the HR bmh (Figure 5P to R). As the C-terminal end of HDAC6 harbours the site of homology and interaction with the ubiquitin binding complexes, this latest profile requires more caution interpreting the association of HR bmh and HDAC6 as a part of the proteasome dependant protein degradation pathway. Taken together the results of the deletion analysis suggested that the HDAC6 deacetylation domain one is able to interact independently with HR bmh and might be responsible for the observed co-localisation with HR bmh. Finally a BLAST analysis revealed that DD1 present striking homologies with a novel motif in the HR protein situated at the N-ter of the protein (Supplemental data). Our data with the cytosolic component HDAC6 left open the question if HR bmh could associate to membrane structures of the cytoplasm. The last aim of this analysis was to focus on its possible partnerships with specific ultrastructures.

The HR bmh protein is detected in the lysosomal compartment

Bearing in mind the high homology of AS117 with the cell surface antigen $\beta 2$ microglobulin, we wanted to establish if HR bmh could be found sequestered in a specific cytoplasmic organelles. We took advantage of antibodies raised against Golgi apparatus (GM130), the endoplasmic reticulum (KDEL), the early endosomes (EEA1) and late endosomes and lysosomes (Lamp1). Cos cells were then transfected with Flag-tagged HR bmh protein and we analysed by immunofluorescence and confocal microscopy the mutant protein localisation with respect to the main subcellular compartments. Figure 6 A to F shows that HR bmh is not detected neither in the Golgi apparatus nor in the endoplasmic reticulum. Similarly Figure 6 G to L illustrates the absence of HR bmh in the early endosomes. By contrast, the antibody Lamp1, detecting late endosomes and lysosomes displays areas of co-localisation with the anti-HA tagged HR bmh (Figure 6M, N and O). These data indicate that HR bmh could be associated with the late endosomes/lysosome compartment. As a whole our analysis is in favour of the idea that HR bmh could be either taken by HDAC6 for cytosol associated processing, or follow a pathway of lysosomal degradation.

These options are to be further explored with appropriate reagents and experimental approaches.

Discussion

In this work we have investigated in cell culture experiments several aspects of the cytoplasmic sequestration of a mutant protein, thought to underlie the mouse bald Mill Hill hairless phenotype (9), (16). We show that HR bmh displays a heterogeneous distribution in the cytoplasm of transfected cells, either in aggregates of nodules, speckles and fibres, interspersed with zones devoid of the protein, or in highly compact areas tightly apposed to the nuclear envelope. We tested the role of the additional sequence AS117 that characterizes the Hairless bmh protein by mutating and deleting the putative LXXLL nuclear export sequence to find out that this part of the protein was not involved in the cytoplasmic localisation. The cytosolic enzyme HDAC6 was identified as a potential partner of HR bmh. Indeed, the IP assays demonstrate that these proteins are able to bind to each other and they co-localise in distinct cytoplasmic zones. Finally, based on homologies between the AS117 fragments and the small cell-surface antigen $\beta 2$ microglobulin, we explored the possible link between HR bmh and the membrane ultrastructures and established that the mutant protein is likely to associate with the late endosome/lysosome compartment.

The heterogeneous distribution of HR bmh is something we treat with extreme caution. Indeed, overexpression of a nuclear protein by transient transfection, especially in Cos cells may be also a transfection artefact. Without making a major point about that, we still consider it as a sign to look for compartments, molecules and functions that might implicate more specifically HR bmh. As the appropriate subcellular localisation is crucial for correct function, we wanted to take into account every possible cue that might point to a specific regulatory pathway. Signal induced activation of transcription factors that change their compartments of residence is well described in immune and inflammatory responses (18)(18), (19). Shuttling between nucleus and cytoplasm was reported for a number of transcription factors involved in the control of hair cycling. The vitamin D receptor, known to regulate the course of hair growth in anagen must be localised in the nucleus and then bind to the enhancers of hair cycle involved downstream genes (20), (16). At other stages of the hair cycle or in the absence of its ligand 1,25(OH)₂D₃ in cell culture experiments, the VDR is detected in the cytoplasm (21). Immunohistochemistry data have demonstrated that a number of other factors that display dynamic changes in their expression patterns in epidermis and hair follicle, might also present distinct differences in the subcellular localisation between hair follicle compartments. Thus, in the case of the C/EBP family of transcription factors shuttling between nucleus and cytoplasm is a mechanism to regulate activities in distinct cells

populations within the hair follicle (12). Interestingly, the HR wild type protein, which has a dynamic pattern of expression in the progression of the hair cycle with highest levels during catagen and complete absence in anagen, has never been detected in the cytoplasm (8). Modulations in the localisation of transcriptional co-regulators relay on the presence of signature motifs like LXXLL, that might not be involved in direct interaction, but are absolutely required for repressive or activating function (22). The LXXLL, originally identified in several nuclear receptor co-activators, is a protein interaction module that has been shown to mediate a variety of ligand induced responses. As the main function of this motif is thought to be linked with assembly of corepressor complexes in the cytoplasm, it is considered to be a part of an effective NES, although nuclear proteins might also harbour LXXLL-like motifs (23). In our hands neither the mutation, nor the deletion of the putative AS117 NES motif modified HR bmh cytoplasmic sequestration. Nevertheless, the AS117 sequence was shown to present homology with the small molecule β 2 microglobulin, a common subunit of cell-surface antigens and involved in protein trafficking (24). This finding urged us to explore a cytoplasmic pathway for HR bmh, where the mutant protein could be a part of cell membrane compartments. Using specific antibodies we have shown that the late endosomes and the lysosomes could shelter HR bmh, while the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the early endosomes are not likely to be preferred sites for its sequestration. One way to explain this result is to consider that HR bmh would be recognized as an aberrant product by effectors of the lysosome pathway and tethered to the structures responsible for redirection for lysosome processing and degradation. A more tempting scenario is offered by the interaction of HR bmh with the cytosolic protein HDAC6. This enzyme is a regulatory agent involved in protein ubiquitination and proteasome dependant protein degradation (14,15,25). If such a partnership is real, the HR bmh could be a part of a Ub-associated signalling pathway, where its functions are not clearly predictable. The role of HDAC6 in this interaction is not likely to be just the one of a simple carrier of HR bmh to the proteasome; In fact, in our hands, the C-terminal, known to mediate binding to Ub is not involved in HR bmh – HDAC6 co-localisation. On the other hand, the C-terminal HR JmJ motif enzymatic functions have never been tested in the context of the additional 117 amino acid sequences lying immediately to the JmJ domain. In an alternative scenario, the important role of the DD1 domain of HDAC6 and its high homology with a novel functional motif at the N-terminal end of the HR protein is in favour of another, and yet unidentified type of partnership between the two molecules that can be dependant on their conformation, and is likely to involve their enzymatic activities and possible common substrates. Further work is

required in order to establish an authentic link between the subcellular localisation of the HR bmh protein and the skin phenotype of the mutant hairless bald Mill Hill mice.

Material and Methods

Cell Culture and Transient transfection assay:

Cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). Media and reagents for cell culture were purchased from Gibco (Invitrogen) unless otherwise indicated. COS-7 cell lines was maintained in DMEM high glucose (4,5g/L) medium containing L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C under 5% CO₂. Cells were plated on 60 mm dishes, each dish containing 1×10^6 cells. Following a 24 h incubation, cells in each well were transfected with 5 µg of total DNA construct using the SuperFect Transfection Reagent according to the manufacturer's instructions (QiaGen). After 12 h of transfection, the cells were washed with phosphate-buffered saline and then used for Western blot or immunofluorescence experiments.

DNA Constructs:

Full length wild-type *Hr* and bmh *Hr* cDNA were subcloned into pcDNA3-Flag expression vectors as described previously (16). HA-HDAC6 and HDAC6 expression vectors were previously described (13). The sequences of all clones were confirmed by sequencing.

Blast analysis:

Hairless and HDAC6 proteins sequences were taken from Swiss-Prot database (accession number: Q61645 and Q9Z2V5 respectively). We added to the sequence the 117 amino acids of bmh mutant form as previously described (16). The blast analysis was processed on T-Coffee (Version 5.13 from Swiss Institute of Bioinformatic) (26).

Immunofluorescence procedures:

Cells were plated onto a 2 wells (2×10^5 cells/well) labtek chamber slide (Nalgen Nunc International). Cells were transiently transfected with plasmid constructs as described above. Two days after transfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphatebuffered saline (PBS) for 5 min at room temperature and permeabilised by the addition of 0.1% Triton X-100. Incubation with primary antibodies (refer to antibodies section) was carried out overnight at 4°C in the PBS-milk solution. After the addition of the

secondary antibodies, cells were washed and counterstained with Hoechst 33258. The slices were then observed under a wide field microscope (Zeiss Axiophot) and confocal microscope.

Immunoprecipitation and Western blotting procedures:

200 µg of a cytosoluble cell extract were incubated with Anti-Flag M2 coupled beads (Sigma) for 2 h. After washing, beads were boiled in loading buffer and analyzed by Western blot: The beads were separated by SDS-PAGE followed by transfer onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% non fat dried milk in TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and incubated for 2 hours with primary antibody (mouse monoclonal anti-HA(11)). The membranes were washed three times for 10 min each with TBST and then probed with secondary antibody (anti-mouse coupled to HRP), washed again with TBST, and developed with ECL Western blotting detection system (Pharmacia Biotech Inc.). Anti-phosphatase cocktail 1, B-Glycerophosphate (Sigma G6251; 25 mM), NaF (Sigma S7920; 5 mM), Complete Tabs (Roche), 50mM MgCl₂, and 5mM CaCl₂ were used during each step of immunoprecipitation.

Antibodies:

For immunoprecipitation we used as primary antibody:

- The mouse monoclonal anti-HA(11) (Reference: F3165 from Covance)

As secondary antibodies:

- The polyclonal goat anti-mouse coupled to HRP (Reference: P0447 from DAKO)

For Immunofluorescence we used as primary antibodies:

- The rabbit polyclonal anti-HA(Y11) (Reference: SC 805 from Tebu)
- The mouse monoclonal M2 anti-Flag (Reference: F3165 from Sigma)
- The mouse monoclonal anti-KDEL (Reference: SPA-827 from Stressgen)
- The rabbit polyclonal anti-EEA1 (Reference: ab29000 from Abcam)
- The rabbit polyclonal anti-LAMP1 (Reference: ab24170 from Abcam)
- The mouse monoclonal anti-GM130 (Reference 610822 from BD Transduction Laboratories). The KDEL, EEA1, GM130 and LAMP1 antibodies were a kind gift from Drs Agnès Belly and Yves Goldberg.

As secondary antibodies:

- The Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Reference: A 11029 from Invitrogen)
- The Alexa Fluor 546 goat anti-mouse (Reference: A 11030 from Invitrogen)
- The Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Reference: A 11034 from Invitrogen)
- The Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Reference: A 11035 from Invitrogen)

Acknowledgements

We thank Drs Yves Goldberg, Cyril Boyaut and Saadi Khochbin for the generous gifts of reagents and helpful discussions. This work was supported by the “Emergence” grant of the Region Rhône – Alpes and by the French Fondation de la Recherche Médicale (SN). M-VB and EF had a PhD fellowship of the French Ministry of National Education. We are grateful to Brigitte Peyrusse for skilful artwork.

Figures Legends

Figure 1. Coexpression of both wild-type and mutant HR in the same cell has no effect on their respective localisation. Cos cells were cotransfected with both Flag-Hr wt and HA-Hr bmh expression vectors. Subsequent localization of each protein was revealed by immunofluorescence using anti-Flag and anti-HA antibodies. As shown on panels A-F, the FITC-labelled (green) wild-type HR protein displays a nuclear localization, while rhodamine (red) labelled HR bmh remains cytoplasmic. On panels G to I, the wild type HR is marked by rhodamine in the nuclei, while HR bmh is FITC - stained in the cytoplasm.

Figure 2. Patterns of cytoplasmic distribution of the HR mutant protein in transfected Cos cells. In addition to the homogeneous expression in the cytoplasm of transfected cells shown in Figure 1, the HR bmh protein is detected in perinuclear domains that can be highly condensed (A and I) or contain compact centres interspersed with specifically stained but decondensed cytoplasmic areas (B, C and F). The mutant protein can also be organised in small and compact speckles distributed all over the cytoplasmic area (F, G and H).

Figure 3. Mutation or deletion of the AS-117 of the HR bmh putative NES do not affect its cellular localisation.

(A). A schematic representation of the fusion proteins Flag-HR wild type, Flag-HR bmh, Flag-HR bmh mutated at the putative NES motif (residues leucine 83 and Leucine 87) and Flag-HR bmh bearing a deletion of the putative NES motif.

(B). Indirect immunofluorescence using a anti-Flag antibody on NIH 3T3 cells transfected by constructs expressing the four proteins described in (A). Neither the point mutation (Flag-HR bmh L83A/L87A), nor the deletion (Flag-HR bmh Δ 35) of the putative NES motif affects the cytoplasmic localisation of these proteins. (C). The BLAST of the AS117 motif in protein banks reveals domains of high homology over about 30 amino acids between the central part of the AS117 and N-terminal and central domains of the small membrane antigen associated β 2-microglobulin.

Figure 4. HR bmh and HDAC6 co-localize in the cytoplasm. A to I – Cells co-expressing Flag-tagged HR bmh (A, D and G, green) and HA-tagged HDAC6 (B, E and H, red). C, F and I show the merge of the two colours. The immunoprecipitation assay (Materials and Methods) is shown on J: Lane 1 – HA-HDAC6/Flag-HR bmh; Lane 2 – HA-HDAC6/Flag-HR wild

type; Lane 3 – HA-HDAC6/Flag-pSK alone; Lane 4 – Flag-HR bmh/HA-pSK; Lane 5 – Flag-pSK; Lane 6 – HA –pSK; Lane 7 – Flag HR wild type/pSK.

Figure 5. HDAC6 deacetylation domain 1 (DD1) is responsible for co-localisation with HR bmh. A to R illustrate co-transfections of Cos cells with Flag-tagged HR bmh and HA-tagged HDAC6 deletion derivatives. The pictures were generated by confocal microscopy. Note that the presence of the DD1 is associated with co-localisation of these two proteins (A to I). In constructs encompassing the DD1 domain alone the colocalisation of HR bmh and HDAC6 is even more widespread than when the whole HDAC6 was transfected (compare Figure 5I and F to Figure 4C, F and I). In the absence of the DD1 the proteins do not co-localise (J to R) and HA-HDAC6 displays either nuclear (K), or weak and diffuse distribution in all of cellular compartments.

Figure 6. HR bmh is associated with the late endosomes/lysosome compartment. Cos cells were transfected with HA-tagged HR bmh and antibodies raised against the principal cytoplasmic ultrastructures were used to detect organelles where HR bmh is located. The pictures were taken by confocal microscopy. A, B and C show that HR bmh is not found in the Golgi apparatus. D, E and F suggest that the endoplasmic reticulum does not associate with the Hairless mutant protein, while G to L illustrates its absence in the early endosomes. Note that the antibody Lamp1, detecting late endosomes and lysosomes displays areas of co-localisation with the anti-HA tagged HR bmh (M, N and O).

References

1. Panteleyev, A. A., Paus, R., Ahmad, W., Sundberg, J. P., and Christiano, A. M. (1998) *Exp Dermatol* **7**(5), 249-267
2. Bernard, B. A. (2002) *Medecine Sciences* **18**(3), 276-280
3. Nonchev, S., Brancaz, M. V., Folco, E., Romero, Y., and Iratni, R. (2006) *Med Sci (Paris)* **22**(5), 525-530
4. Potter, G. B., Beaudoin, G. M., 3rd, DeRenzo, C. L., Zarach, J. M., Chen, S. H., and Thompson, C. C. (2001) *Genes Dev* **15**(20), 2687-2701
5. Djabali, K., Aita, V. M., and Christiano, A. M. (2001) *J Cell Sci* **114**(Pt 2), 367-376
6. Potter, G. B., Zarach, J. M., Sisk, J. M., and Thompson, C. C. (2002) *Mol Endocrinol* **16**(11), 2547-2560
7. Thompson, C. C., and Bottcher, M. C. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16), 8527-8532
8. Beaudoin III, G. M. J., Sisk, J. M., Coulombe, P. A., and Thompson, C. C. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41), 14653-14658
9. Brancaz, M. V., Iratni, R., Morrison, A., Mancini, S. J., Marche, P., Sundberg, J., and Nonchev, S. (2004) *Exp Mol Pathol* **76**(2), 173-181
10. Thompson, C. C., Sisk, J. M., and Beaudoin, G. M., 3rd. (2006) *Cell Cycle* **5**(17)
11. Zarach, J. M., Beaudoin, G. M., 3rd, Coulombe, P. A., and Thompson, C. C. (2004) *Development* **131**(17), 4189-4200
12. Bull, J. J., Muller-Rover, S., Chronnell, C. M., Paus, R., Philpott, M. P., and McKay, I. A. (2002) *J Invest Dermatol* **118**(1), 17-24
13. Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001) *Mol Cell Biol* **21**(23), 8035-8044
14. Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000) *Curr Biol* **10**(12), 747-749
15. Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**(2), 162-166

16. Brancaz-Bouvier, M., Folco, E., Salameire, D., Romero, Y., Iratni, R., and Nonchev, S. (2007) *J Invest Dermatol*
17. Djabali, K., and Christiano, A. M. (2004) *Differentiation* **72**(8), 410-418
18. Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996) *Cell* **87**(1), 13-20
19. Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3), 1014-1019
20. Bikle, D. D., Ng, D., Oda, Y., Hanley, K., Feingold, K., and Xie, Z. (2002) *J Invest Dermatol* **119**(5), 1109-1113
21. Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S., and Ozono, K. (1999) *J Biol Chem* **274**(47), 33531-33538
22. Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., and Shuai, K. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6), 3203-3207
23. Ko, L., Cardona, G. R., and Chin, W. W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11), 6212-6217
24. Parnes, J. R., and Seidman, J. G. (1982) *Cell* **29**(2), 661-669
25. Khochbin, S., and Kao, H. Y. (2001) *FEBS Lett* **494**(3), 141-144
26. Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000) *Journal of molecular biology* **302**(1), 205-217

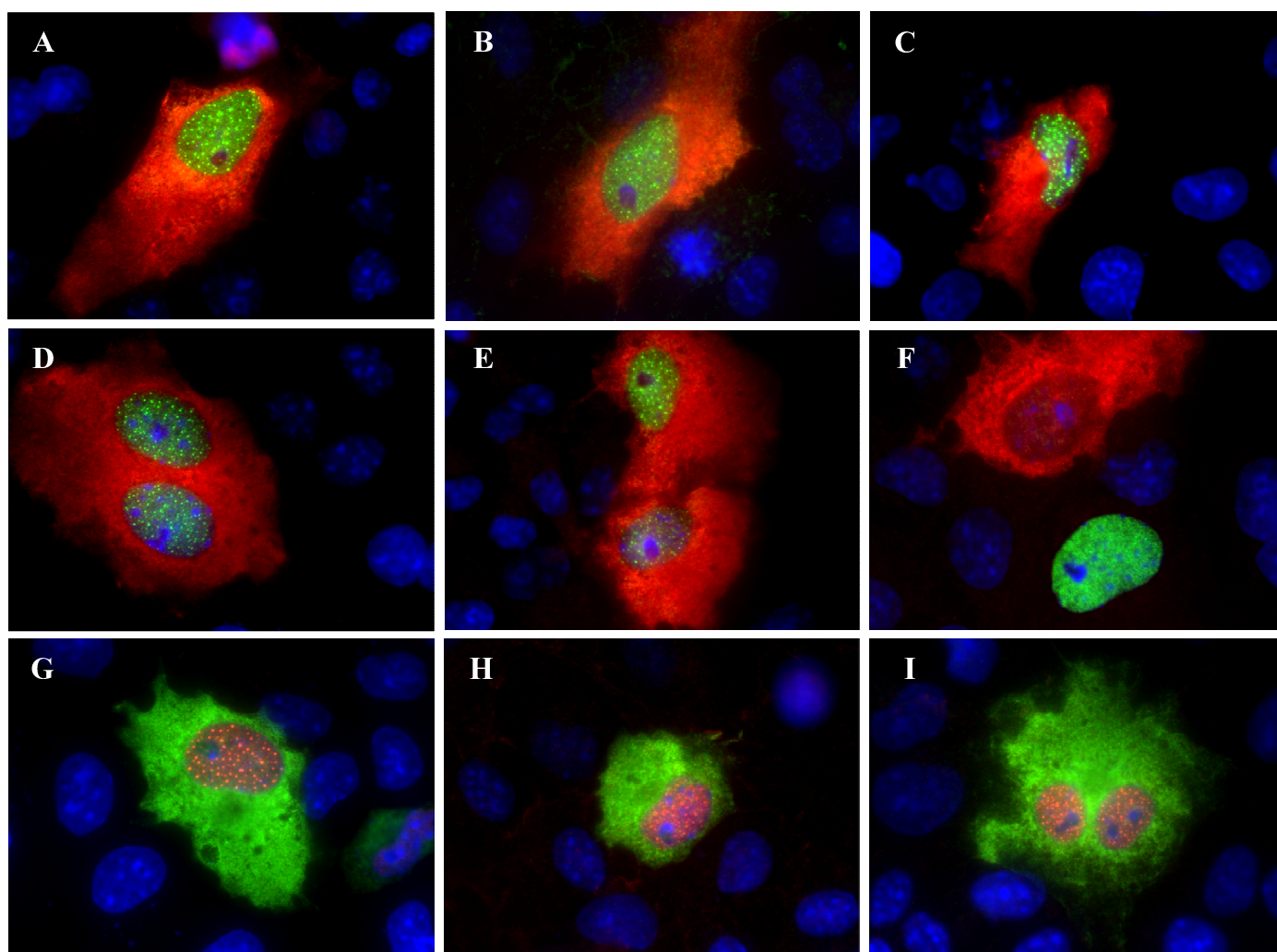


Figure 1

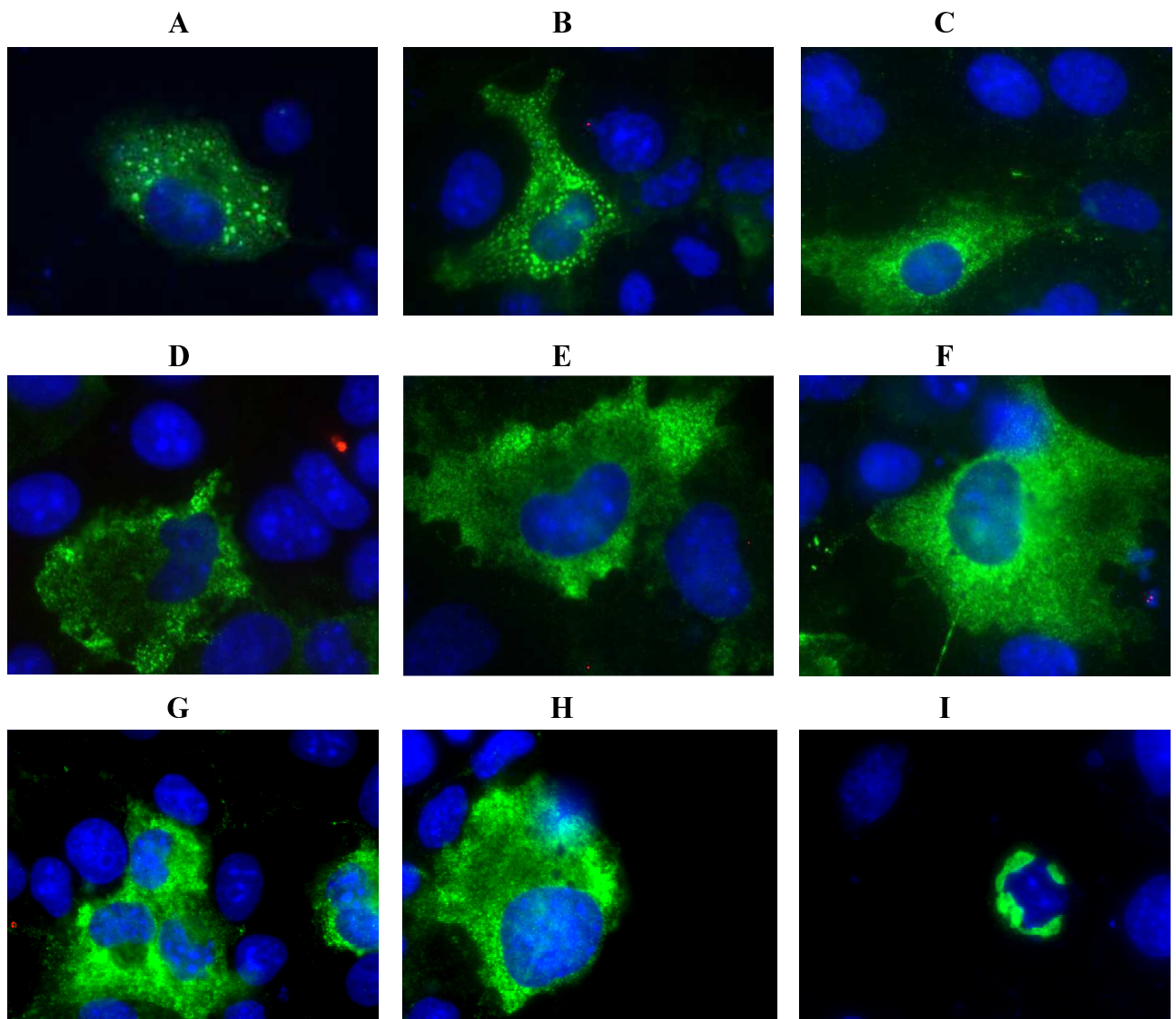


Figure 2

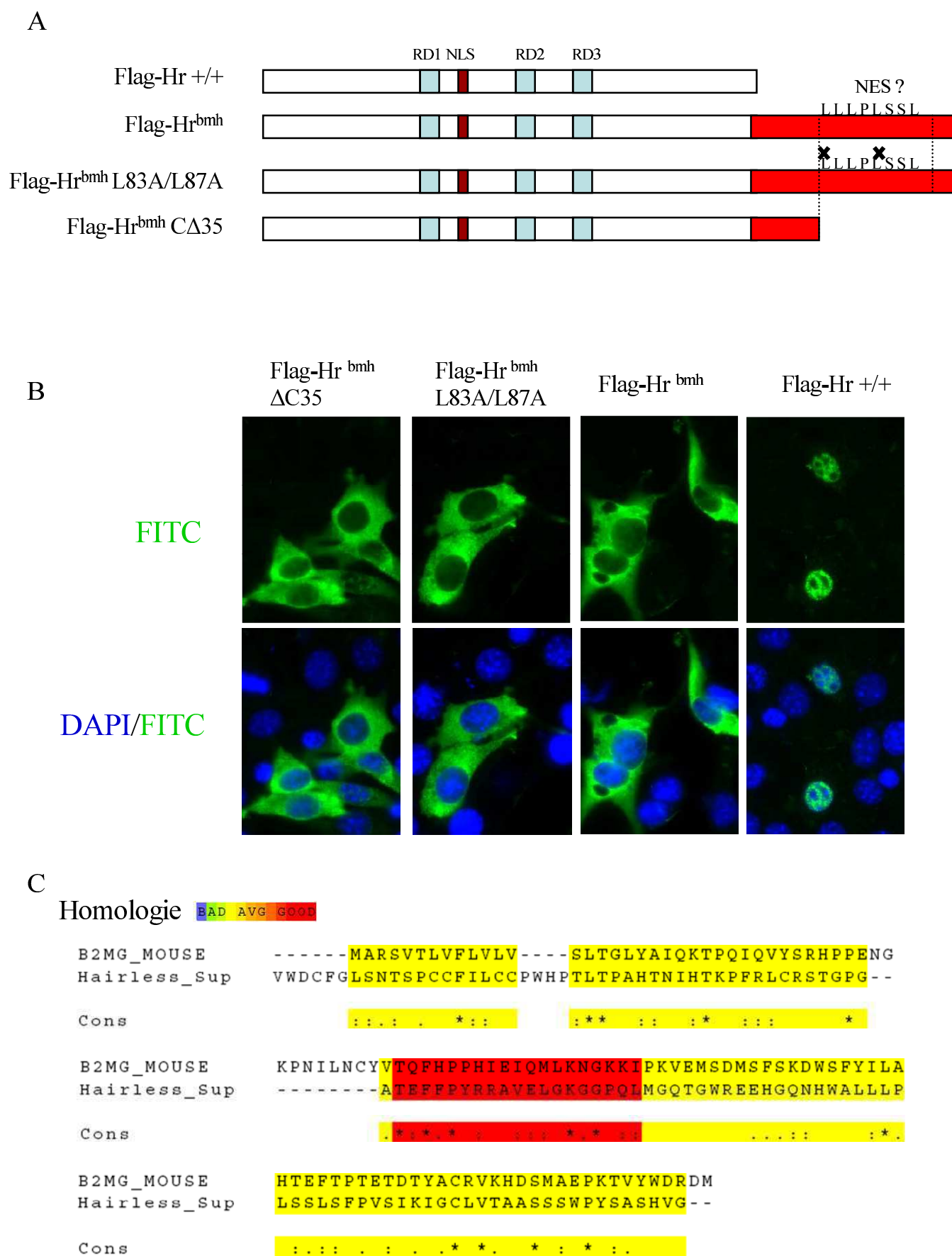


Figure 3

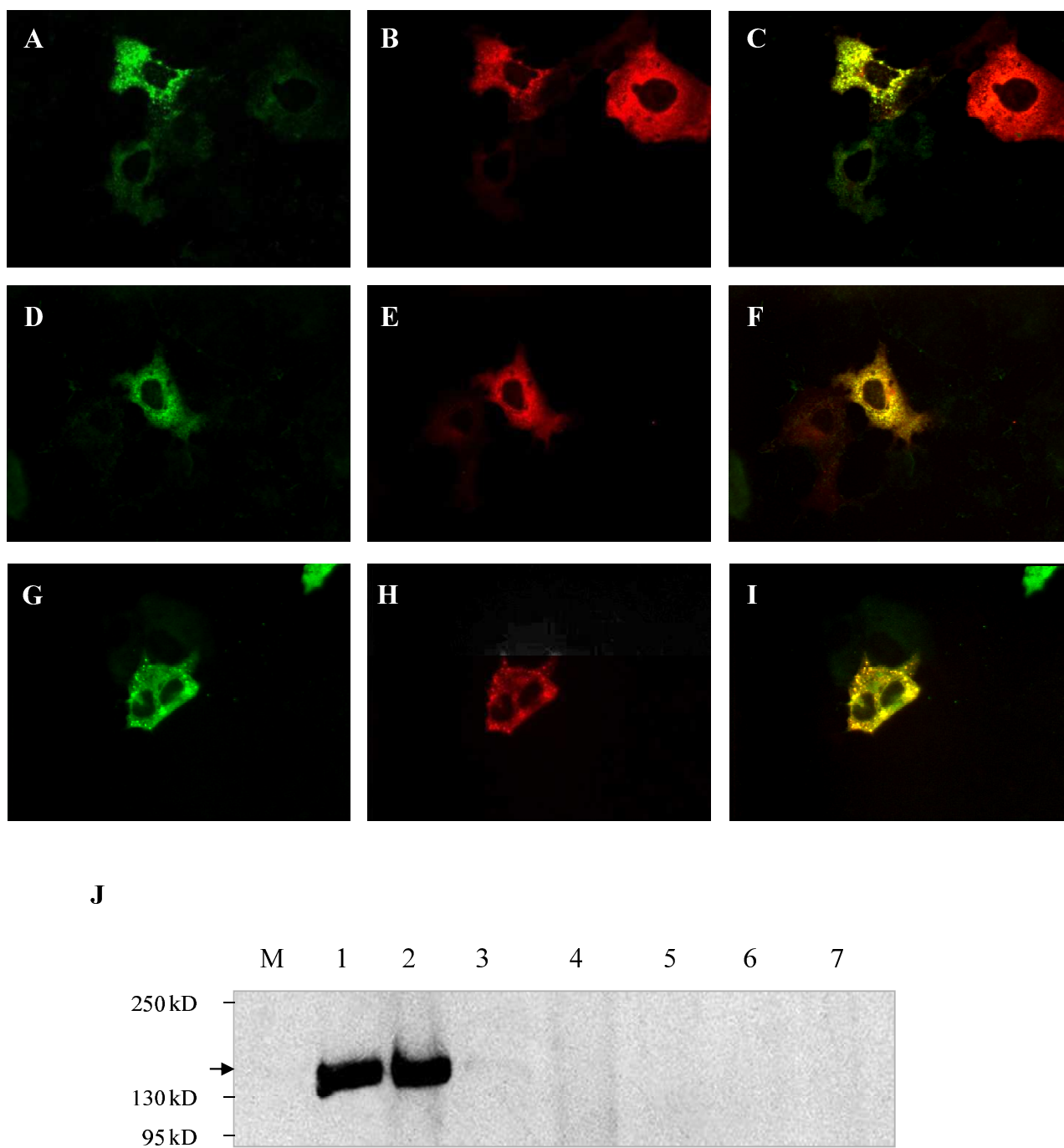


Figure 4

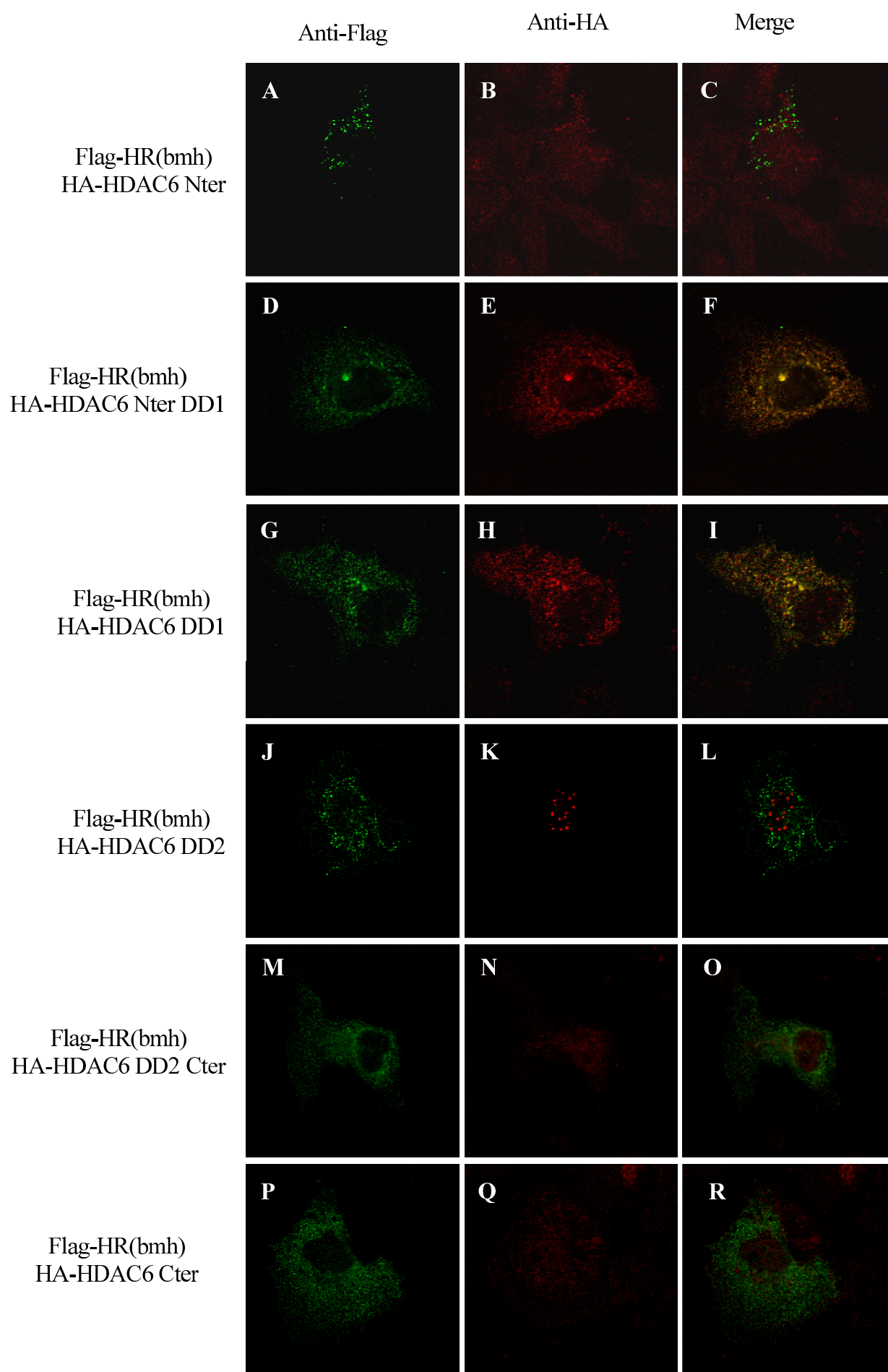


Figure 5

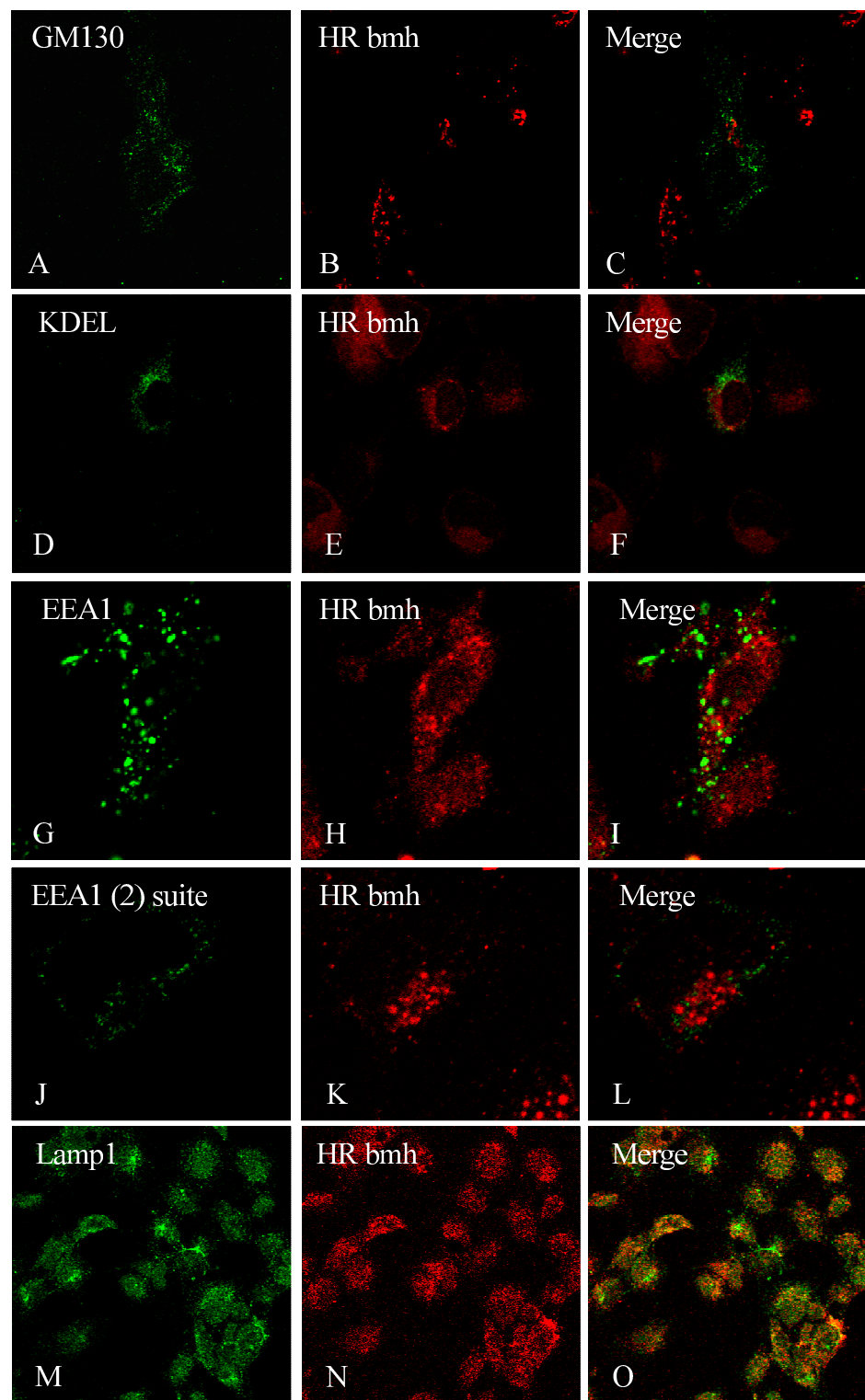


Figure 6

DISCUSSION

Chapitre 3

Discussion

Les observations accumulées sur les mutants *hairless* des Mammifères et les approches de pointe appliquées au cours de ces dernières années dans l'étude des fonctions de la protéine Hairless confirment que le gène *hairless* (*Hr*) est un facteur-clé dans le contrôle du cycle pileux [204, 242, 241]. Il serait responsable de la coordination de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration des cellules souches et dans la signalisation entre les différentes composantes du follicule pileux. En effet, chez le Mammifère adulte, le renouvellement cyclique du follicule pileux dépend de cellules épithéliales localisées dans des niches spécialisées au niveau de la gaine pileuse externe. Ces cellules souches sont à l'origine de précurseurs multipotents qui migrent pour peupler l'épiderme et régénérer les follicules pileux [194]. Les grandes voies de signalisation Wnt, Sonic hedgehog (Shh) et BMP gouvernent ce processus de régénération, mais les molécules qui confèrent de la spécificité n'ont pas encore été identifiées [127, 91, 53].

3.1 Contrôle du gène *Hr* – Une boucle d'autorégulation ?

Par le profil de son expression, le gène *Hr* est un bon candidat pour jouer ce rôle, mais les mécanismes moléculaires de sa régulation sont loin d'être élucidés. En effet, les séquences en amont du gène *Hr* sont très mal explorées et des éléments régulateurs capables de diriger l'expression génique de manière spécifique dans le temps et dans l'espace n'ont jamais été identifiés. Des études plutôt fragmentées avaient initié la description des régions proximales du gène *Hr* chez le rat et chez l'homme [243]. La présence de TRE fonctionnels à 9 kb en amont du gène *Hr* du rat ainsi que la capacité de la protéine HR à s'associer au TR, ont suggéré l'existence d'une boucle d'autorégulation du gène par des complexes protéiques dont la protéine HR ferait partie [168]. Il a été observé que cette boucle ne serait opérationnelle que dans les cellules d'origine neuronale, alors que dans les kératinocytes, en conditions de transfection transitoire, l'hormone thyroïdienne n'aurait pas d'impact sur les niveaux d'expression des gènes rapporteurs utilisés. Les résultats que nous avons obtenus ne confirment pas cette hypothèse. Nous avons pu isoler un fragment de 1,1 kb (RE1) dont la fonction est conditionnée par la présence de

TRE, VDRE et d'un autre motif régulateur qui interagit avec ces éléments. Aussi bien dans des cellules d'origine neurale que dans celles de source cutanée, l'intégrité des TRE étaient requise pour que le RE1 puisse activer la transcription du rapporteur. Il est à noter que, dans les deux cas, les lignées cellulaires utilisées n'étaient pas identiques, ce que pourrait partiellement expliquer l'opposition de ces observations. Sur le plan plus général de l'interaction de HR avec les récepteurs nucléaires d'hormones, nos résultats sont en faveur d'une vue plus prudente en ce qui concerne la séparation nette de la signalisation T3/TR/HR qui ne serait efficace que dans le système nerveux, de celle de D3/VDR/HR confinée aux structures cutanées [244]. Les arguments pour une telle prudence et contre une simplification caricaturale des circuits régulateurs à la base de la différenciation cellulaire sont présents à plusieurs niveaux d'observation. Nos données montrent que le promoteur proximal du gène *Hr* doit déjà intégrer les deux signalisations mentionnées pour un fonctionnement correct en culture cellulaire. De plus, des facteurs en amont encore non-identifiés, participent au contrôle et modulent les réponses aux hormones. Il faut reconnaître que le rôle du VDR en tant que partenaire déterminant d'Hairless au cours de la morphogenèse et le cycle du poil est solidement établi [135, 192]. Les transcrits et les produits protéiques de ces deux gènes co-localisent dans les cellules de la gaine externe, de la gaine interne et au niveau de la matrice du poil [191]. La ressemblance des phénotypes mutants HR et VDR chez la souris et l'homme ainsi que les robustes dissections moléculaires et les analyses biochimiques valident l'adéquation biologique du complexe HR-VDR [245, 191]. Malgré l'absence de phénotype cutané spectaculaire, les invalidations des gènes des récepteurs *TR α 1,2*, *TR β 1-3*, ainsi que leurs isoformes tronquées naturelles chez la souris ont généré des anomalies prononcées de certains épithéliums et même des dérégulations profondes de la croissance et l'homéostasie du pelage [246]. Dans l'optique de la boucle d'autorégulation par l'intermédiaire des sites de fixation pour les récepteurs d'hormones, HR apparaît donc comme un co-régulateur capable d'orchestrer les actions de VDR et TR. Il est moins facile de spéculer sur l'importance de l'organisation des modules régulateurs chez les Mammifères. Une homologie significative est notée dans les séquences en amont du site d'initiation de la transcription chez la souris, le rat et l'homme. L'examen *in silico* révèle une conservation et un réarrangement de fragments enrichis en sites de fixation putatifs de facteurs de transcription. Malgré l'absence d'études fonctionnelles poussées, la détection de consensus de TRE, VDRE, RARE, ou de sites de fixation de Lef1, Smad 1 ou de protéines HOX est fortement en faveur d'un regroupement des éléments cis au cours de l'évolution. Avec l'avancée des méthodes qui localisent les facteurs de transcription sur le génome entier, puis décryptent les séquences régulatrices et les utilisent dans des comparaisons phylogénétiques, la présence du gène *hairless* uniquement chez les Mammifères deviendrait moins énigmatique.

3.2 Le phénotype hairless

Sur le terrain plus familier de l'ontogenèse, le recrutement du gène *hairless* paraît limité au contrôle du cycle pileux. Comprendre en termes moléculaires la repousse de la tige du poil reste un défi pour la biologie cutanée. Les mutations spontanées de *Hr* ont été les premières sources d'outils génétiques pour aborder l'étude du cycle du poil. Récemment, en plus des mutants naturels, l'inactivation de *Hr* par recombinaison homologe en cellules souches embryonnaires a été réalisée et la succession d'une morphogenèse embryonnaire correcte avec une perte au cours du premier cycle de croissance chez l'adulte a été retrouvée tout comme chez la totalité des mutants connus [233]. A l'aide de ces souris, il a été possible de montrer que *Hr* réprime le gène *Wise*, un inhibiteur de la signalisation Wnt, ce qui permettrait chez les souris normales l'entrée en phase anagène et une reprise de la pousse du poil [157]. Cette voie de signalisation est particulièrement importante pour l'activation et la migration des cellules souches et leur participation dans la régénération du follicule pileux. De plus, la région promotrice du gène *Wise*, tout comme celle de *Hr* contient un ensemble de VDRE, TRE et RORE [231, 165], ce qui illustre bien la complexité des réseaux intriqués et la hiérarchie dans la régulation des phases successives du cycle pileux. Dans le travail de thèse, le décryptage de cette hiérarchie a été abordé par l'utilisation d'un outil génétique précieux la lignée mutante bald Mill Hill (*bmh*). Comme il a déjà été décrit, l'allèle *bmh* a subi une délétion du codon stop et de ce fait la protéine mutante est de plus grande taille et présente une localisation cytoplasmique en culture cellulaire et in vivo. Un premier résultat solide obtenu in vivo avec ces souris était de constater qu'en absence de protéine HR dans les noyaux des cellules des gaines folliculaires, la protéine VDR était correctement présente, ce qui positionne clairement le gène *Hr* en aval du gène *Vdr*. Les données de la thèse complètent et confirment des observations symétriques qui dénotent une surexpression spectaculaire du gène *Hr* chez les souris *Vdr* nulles [245]. D'autre part, des résultats in vitro et en culture cellulaire illustrent la capacité de la protéine mutante HR *bmh* à se fixer physiquement à VDR. Pourtant malgré l'intégrité de ses domaines RD et VDR-IDs, la protéine HR *bmh* est incapable de réprimer la transcription activée par VDR en absence ou en présence du ligand vitamine D [240]. Dans le cas des mutants *bmh*, la mise au point des activités de transcription pourrait être encore plus subtile si l'on tenait compte de la possibilité d'un transit nucléo-cytoplasmique de la protéine mutante HR *bmh*. Les données obtenues dans ce travail sont loin d'épuiser les possibilités offertes par la souris *bmh*, en ce qui concerne le jeu des molécules de signal au cours du cycle pileux. La localisation subcellulaire de HR *bmh* pourrait en effet être un moyen de tester de quel façon HR interfère avec la signalisation Wnt. Une analyse comparative de l'expression et de la répartition des inhibiteurs *Wise* et *Soggy* entre les souris *Hr*^{-/-} ou *bmh* serait à même de trancher si HR est impliqué directement dans le contrôle des modulateurs de la voie Wnt. Il a été également suggéré, que pendant l'embryogenèse le gène mutant *Hr*^{*rhbmh*} modifiait la régulation de gènes *Hox* au niveau de la placode du poil [177]. Comme un certain nombre de gènes

Wnt et le gène *Wise*, lui-même interagissent avec des gènes *Hox* dans différents contextes cellulaires, il est concevable que les différentes mutations du gène *Hr* puissent être mises à contribution pour identifier de nouveaux facteurs dans les cascades d'interactions géniques qui gouvernent l'entrée en phase anagène. Enfin, des marqueurs de cellules souches appliqués directement dans la zone du renflement de la gaine externe du follicule mutant (utricule) permettraient de suivre dans le temps la dégradation morphologique des niches de cellules précurseurs du follicule pileux et comparer en termes moléculaires la phase catagène normale et la perte pathologique et irréversible de l'ébauche pileuse.

3.3 Les partenaires cytoplasmiques de la protéine HR bmh

La recherche de partenaires cytoplasmiques de HR qui seraient impliqués dans diverses voies de signalisation pose deux grandes questions abordées dans la dernière partie de cette thèse, à savoir, quelle est la destinée de la protéine mutante HR bmh et comment sa localisation aberrante affecterait le cycle pileux.

Les tests de la séquence additionnelle AS-117 par délétion et mutations du motif putatif NES n'ont pas permis de comprendre les causes de sa séquestration dans le cytoplasme. Il n'a pas été établi comment les modes de repliement dans l'espace de la protéine HR bmh perturberaient la reconnaissance du signal de la localisation nucléaire (NLS) et si la séquence supplémentaire C'-AS117 est impliquée dans ce processus. De manière intéressante, l'analyse par BLAST de la séquence additionnelle C'-AS117 a permis de trouver un seul candidat à forte homologie de séquence primaire avec une possibilité de repliement secondaire, confinée dans la partie centrale de C'-AS117 : la protéine $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2$ MG). Cette petite protéine est connue pour sa localisation membranaire et fait partie du complexe CMH de classe I chez la souris [247]. L'interaction physique et fonctionnelle entre HR bmh et ($\beta 2$ MG) n'est pas encore étudiée, mais cette possibilité posait directement la question de savoir si HR bmh se retrouve dans les membranes des ultrastructures cellulaires ou si c'est plutôt une protéine du cytosol. Nos résultats d'analyse par immunofluorescence et microscopie confocale à l'aide d'anticorps qui reconnaissent les organites subcellulaires n'ont pas permis de détecter la protéine mutante HR bmh dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Les endosomes précoces ont été également étudiés et il a été constaté que les zones d'immunoréactivité des deux anticorps n'étaient pas superposables. Par contre, la protéine HR bmh a été détectée dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Malgré le caractère préliminaire de ces résultats, on pourrait envisager un scénario où la séquence C'-AS117, par une interaction physique avec des protéines membranaires, serait capable d'ancrer HR bmh dans les structures membranaires du cytoplasme et l'exposer finalement à la voie de dégradation lysosomale. A nos yeux, l'alternative de voir la protéine HR bmh comme une composante fonctionnelle du cytosol est bien plus probable. Cette perspective tient compte du fait que la protéine HR normale exerce son action de répression en participant dans des complexes multiprotéiques où elle est associée à des histones déacétylases

(HDACs). Le lien physique avec HDAC5, histone déacétylase de type 1 a été bien documenté [165]. Or, cette HDAC5 a la particularité de voir son activité contrôlée par sa localisation intracellulaire [248]. Il est envisageable que la protéine HR bmh soit une molécule supplémentaire d'ancrage d'HDAC5 qui perturberait les fonctions nucléaires normales de cette dernière en la retenant dans le cytoplasme. Une couche de complexité est ajoutée par la présence dans la protéine HR d'un domaine caractéristique JmjC, conservé de la levure à l'homme et qui est la signature d'une grande famille d'histone déméthylases [198]. Il se trouve que dans la protéine mutante HR bmh, ce domaine JmjC est en continuité avec la C'-AS117. Piégée dans le cytoplasme, la protéine HR bmh, qui est déjà capable de s'associer aux histone déacétylases, pourrait alors modifier la déméthylation des histones et générer des conséquences biologiques, en ce qui concerne la régulation spatiale et temporelle de la transcription de gènes cibles [235]. Le partenaire cytoplasmique de HR bmh identifié dans ce travail de thèse est la protéine HDAC6, une protéine cytosolique qui a la propriété de faire la navette entre noyau et cytoplasme [249, 250, 251]. Cette protéine est un maillon clé entre les voies de signalisation d'acétylation et d'ubiquitination et assure cette fonction en se liant à l'ubiquitine. L'interaction physique entre HDAC6 et HR bmh et leur co-localisation dans des zones spécifiques du cytoplasme suggère que la protéine HR bmh pourrait être ciblée par la voie UFD, c'est à dire sujette à une dégradation dépendante du protéasome. Notre étude a montré que la co-localisation des deux partenaires en condition de transfection transitoire dépendait du domaine DD1 d'HDAC6. Cette répartition dans le cytoplasme n'est pas affectée par la présence ou l'absence du domaine C-terminal de HDAC6, responsable de la liaison avec l'ubiquitine. La signification physiologique de ce résultat serait plus simple à interpréter si l'on assume que le cycle du poil est un processus de remodelage avec des phases de dégradation et de régénération. Il existe très peu d'éléments qui permettraient de lier les phénomènes d'apoptose (normaux ou pathologiques) au cours du cycle pileux à la dégradation protéique dépendant du protéasome. Certains inhibiteurs du protéasome affectent les voies de transduction des signaux Wnt, Hedgehog et Bmp, de façon que la régression du protéasome stimulerait l'induction de l'anagène et la croissance pileuse. Dans ce scénario élargi, la protéine HR, en plus de son rôle de co-répresseur de récepteurs nucléaires d'hormones, serait une cible moléculaire capable d'intégrer et de coordonner l'ensemble des messages cellulaires concernant la dynamique du cycle pileux chez les Mammifères.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] A. Lucarz and G. Brand. Current considerations about merkel cells. *Eur J Cell Biol*, 86(5) :243–51, 2007.
- [2] C. Blanpain and E. Fuchs. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22 :339–73, 2006.
- [3] M. Perez-Moreno, C. Jamora, and E. Fuchs. Sticky business : orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112(4) :535–48, 2003.
- [4] M. B. Omary, P. A. Coulombe, and W. H. McLean. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med*, 351(20) :2087–100, 2004.
- [5] E. Fuchs and S. Raghavan. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3(3) :199–209, 2002.
- [6] E. Fuchs. Scratching the surface of skin development. *Nature*, 445(7130) :834–42, 2007.
- [7] C. Prost-Squarcioni. [histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)*, 22(2) :131–7, 2006.
- [8] Y. Scrivener and B. Cribier. [morphology of sweat glands]. *Morphologie*, 86(272) :5–17, 2002.
- [9] M. L. Mikkola and S. E. Millar. The mammary bud as a skin appendage : unique and shared aspects of development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 11(3-4) :187–203, 2006.
- [10] R. Paus, S. Muller-Rover, C. Van Der Veen, M. Maurer, S. Eichmuller, G. Ling, U. Hofmann, K. Foitzik, L. Mecklenburg, and B. Handjiski. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol*, 113(4) :523–32, 1999.
- [11] C. Niemann and F. M. Watt. Designer skin : lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol*, 12(4) :185–92, 2002.
- [12] D. Dhouailly. Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. In *Frontier Matrix Biology*, 4 :85–91, 1977.
- [13] M. H. Hardy. Vitamin a and the epithelial-mesenchymal interactions in skin differentiation. *Epithelial-Mesenchymal Interactions In Development*, pages 163–188, 1983.

-
- [14] E. Fuchs, B. J. Merrill, C. Jamora, and R. DasGupta. At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell*, 1(1) :13–25, 2001.
- [15] S. Muller-Rover, B. Handjiski, C. van der Veen, S. Eichmuller, K. Foitzik, I. A. McKay, K. S. Stenn, and R. Paus. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, 117(1) :3–15, 2001.
- [16] K. S. Stenn, N. J. Combates, K. J. Eilertsen, J. S. Gordon, J. R. Pardinias, S. Parimoo, and S. M. Prouty. Hair follicle growth controls. *Dermatol Clin*, 14(4) :543–58, 1996.
- [17] K. S. Stenn and R. Paus. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev*, 81(1) :449–494, 2001.
- [18] V. Bergoglio, F. Larcher, O. Chevallier-Lagente, A. Bernheim, O. Danos, A. Sarasin, M. D. Rio, and T. Magnaldo. Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using cd24. *Mol Ther*, 15(12) :2186–93, 2007.
- [19] C. S. Potten. The epidermal proliferative unit : the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet*, 7(1) :77–88, 1974.
- [20] C. S. Potten and J. H. Hendry. Letter : Clonogenic cells and stem cells in epidermis. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 24(5) :537–40, 1973.
- [21] L. Alonso and E. Fuchs. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1 :11830–5, 2003.
- [22] C. S. Potten, L. Kovacs, and E. Hamilton. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet*, 7(3) :271–83, 1974.
- [23] J. R. Bickenbach and I. C. Mackenzie. Identification and localization of label-retaining cells in hamster epithelia. *J Invest Dermatol*, 82(6) :618–22, 1984.
- [24] I. C. Mackenzie. Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol*, 109(3) :377–83, 1997.
- [25] G. Cotsarelis, T. T. Sun, and R. M. Lavker. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit : implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 61(7) :1329–37, 1990.
- [26] R. J. Morris and C. S. Potten. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif*, 27(5) :279–89, 1994.
- [27] K. Kobayashi, A. Rochat, and Y. Barrandon. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(15) :7391–5, 1993.
- [28] A. Rochat, K. Kobayashi, and Y. Barrandon. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, 76(6) :1063–73, 1994.

- [29] H. Oshima, A. Rochat, C. Kedzia, K. Kobayashi, and Y. Barrandon. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 104(2) :233–45, 2001.
- [30] P. H. Jones and F. M. Watt. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73(4) :713–24, 1993.
- [31] J. Legg, U. B. Jensen, S. Broad, I. Leigh, and F. M. Watt. Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development*, 130(24) :6049–63, 2003.
- [32] Y. Nakamura, K. Fukami, H. Yu, K. Takenaka, Y. Kataoka, Y. Shirakata, S. Nishikawa, K. Hashimoto, N. Yoshida, and T. Takenawa. Phospholipase cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment. *Embo J*, 22(12) :2981–91, 2003.
- [33] M. Matic, W. H. Evans, P. R. Brink, and M. Simon. Epidermal stem cells do not communicate through gap junctions. *J Invest Dermatol*, 118(1) :110–6, 2002.
- [34] A. A. Panteleyev, C. A. Jahoda, and A. M. Christiano. Hair follicle predetermination. *J Cell Sci*, 114(Pt 19) :3419–31, 2001.
- [35] T. Tumbar, G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W. E. Lowry, M. Rendl, and E. Fuchs. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 303(5656) :359–63, 2004.
- [36] M. Ito, Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R. J. Morris, and G. Cotsarelis. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*, 11(12) :1351–4, 2005.
- [37] V. Levy, C. Lindon, B. D. Harfe, and B. A. Morgan. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*, 9(6) :855–61, 2005.
- [38] R. M. Lavker and T. T. Sun. Epidermal stem cells : properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25) :13473–5, 2000.
- [39] G. Taylor, M. S. Lehrer, P. J. Jensen, T. T. Sun, and R. M. Lavker. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 102(4) :451–61, 2000.
- [40] T. Argyris. Kinetics of epidermal production during epidermal regeneration following abrasion in mice. *Am J Pathol*, 83(2) :329–40, 1976.
- [41] N. B. Ivanova, J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore, and I. R. Lemischka. A stem cell molecular signature. *Science*, 298(5593) :601–4, 2002.
- [42] M. Ramalho-Santos, S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan, and D. A. Melton. "stemness" : transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*, 298(5593) :597–600, 2002.
- [43] G. Cotsarelis. Epithelial stem cells : a folliculocentric view. *J Invest Dermatol*, 126(7) :1459–68, 2006.

- [44] M. H. Hardy. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet*, 8(2) :55–61, 1992.
- [45] S. E. Millar. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*, 118(2) :216–25, 2002.
- [46] T. X. Jiang, H. S. Jung, R. B. Widelitz, and C. M. Chuong. Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordia. *Development*, 126(22) :4997–5009, 1999.
- [47] G. Barsh. Of ancient tales and hairless tails. *Nat Genet*, 22(4) :315–6, 1999.
- [48] A. Wodarz and R. Nusse. Mechanisms of wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14 :59–88, 1998.
- [49] R. DasGupta and E. Fuchs. Multiple roles for activated lef/tcf transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*, 126(20) :4557–68, 1999.
- [50] K. Kratochwil, M. Dull, I. Farinas, J. Galceran, and R. Grosschedl. Lef1 expression is activated by bmp-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev*, 10(11) :1382–94, 1996.
- [51] S. Noramly, A. Freeman, and B. A. Morgan. beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development*, 126(16) :3509–21, 1999.
- [52] R. Schmidt-Ullrich and R. Paus. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*, 27(3) :247–61, 2005.
- [53] S. Reddy, T. Andl, A. Bagasra, M. M. Lu, D. J. Epstein, E. E. Morrisey, and S. E. Millar. Characterization of wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of wnt5a as a target of sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev*, 107(1-2) :69–82, 2001.
- [54] B. St-Jacques, H. R. Dassule, I. Karavanova, V. A. Botchkarev, J. Li, P. S. Danielian, J. A. McMahon, P. M. Lewis, R. Paus, and A. P. McMahon. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol*, 8(19) :1058–68, 1998.
- [55] R. B. Widelitz, T. X. Jiang, C. W. Chen, N. S. Stott, H. S. Jung, and C. M. Chuong. Wnt-7a in feather morphogenesis : involvement of anterior-posterior asymmetry and proximal-distal elongation demonstrated with an in vitro reconstitution model. *Development*, 126(12) :2577–87, 1999.
- [56] J. Huelsken, R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, and W. Birchmeier. beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 105(4) :533–45, 2001.
- [57] C. van Genderen, R. M. Okamura, I. Farinas, R. G. Quo, T. G. Parslow, L. Bruhn, and R. Grosschedl. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in lef-1-deficient mice. *Genes Dev*, 8(22) :2691–703, 1994.

- [58] C. M. Chuong, R. B. Widelitz, S. Ting-Berreth, and T. X. Jiang. Early events during avian skin appendage regeneration : dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. *J Invest Dermatol*, 107(4) :639–46, 1996.
- [59] H. S. Jung, P. H. Francis-West, R. B. Widelitz, T. X. Jiang, S. Ting-Berreth, C. Tickle, L. Wolpert, and C. M. Chuong. Local inhibitory action of bmps and their relationships with activators in feather formation : implications for periodic patterning. *Dev Biol*, 196(1) :11–23, 1998.
- [60] R. B. Widelitz, T. X. Jiang, A. Noveen, C. W. Chen, and C. M. Chuong. Fgf induces new feather buds from developing avian skin. *J Invest Dermatol*, 107(6) :797–803, 1996.
- [61] H. Song, Y. Wang, and P. F. Goetinck. Fibroblast growth factor 2 can replace ectodermal signaling for feather development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(19) :10246–9, 1996.
- [62] J. P. Viallet, F. Prin, I. Olivera-Martinez, E. Hirsinger, O. Pourquie, and D. Dhouailly. Chick delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev*, 72(1-2) :159–68, 1998.
- [63] J. M. Revest, B. Spencer-Dene, K. Kerr, L. De Moerlooze, I. Rosewell, and C. Dickson. Fibroblast growth factor receptor 2-iiiib acts upstream of shh and fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of fgf8, fgf10, msx1, or bmp4. *Dev Biol*, 231(1) :47–62, 2001.
- [64] R. B. Widelitz, T. X. Jiang, J. Lu, and C. M. Chuong. beta-catenin in epithelial morphogenesis : conversion of part of avian foot scales into feather buds with a mutated beta-catenin. *Dev Biol*, 219(1) :98–114, 2000.
- [65] S. Noramly and B. A. Morgan. Bmps mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development*, 125(19) :3775–87, 1998.
- [66] V. A. Botchkarev, N. V. Botchkareva, W. Roth, M. Nakamura, L. H. Chen, W. Herzog, G. Lindner, J. A. McMahon, C. Peters, R. Lauster, A. P. McMahon, and R. Paus. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol*, 1(3) :158–64, 1999.
- [67] V. A. Botchkarev, N. V. Botchkareva, A. A. Sharov, K. Funa, O. Huber, and B. A. Gilchrist. Modulation of bmp signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J Invest Dermatol*, 118(1) :3–10, 2002.
- [68] A. Feijen, M. J. Goumans, and A. J. van den Eijnden-van Raaij. Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins. *Development*, 120(12) :3621–37, 1994.
- [69] C. Jamora, R. DasGupta, P. Kocieniewski, and E. Fuchs. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, 422(6929) :317–22, 2003.

- [70] A. Ohyama, F. Saito, H. Ohuchi, and S. Noji. Differential expression of two bmp antagonists, gremlin and follistatin, during development of the chick feather bud. *Mech Dev*, 100(2) :331–3, 2001.
- [71] V. J. Roberts and S. L. Barth. Expression of messenger ribonucleic acids encoding the inhibin/activin system during mid- and late-gestation rat embryogenesis. *Endocrinology*, 134(2) :914–23, 1994.
- [72] S. A. Ting-Berreth and C. M. Chuong. Local delivery of tgf beta2 can substitute for placode epithelium to induce mesenchymal condensation during skin appendage morphogenesis. *Dev Biol*, 179(2) :347–59, 1996.
- [73] S. A. Ting-Berreth and C. M. Chuong. Sonic hedgehog in feather morphogenesis : induction of mesenchymal condensation and association with cell death. *Dev Dyn*, 207(2) :157–70, 1996.
- [74] K. Foitzik, R. Paus, T. Doetschman, and G. P. Dotto. The tgf-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, 212(2) :278–89, 1999.
- [75] M. L. Mikkola and I. Thesleff. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(3-4) :211–24, 2003.
- [76] D. J. Headon and P. A. Overbeek. Involvement of a novel tn timerceptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet*, 22(4) :370–4, 1999.
- [77] M. L. Mikkola, J. Pispa, M. Pekkanen, L. Paulin, P. Nieminen, J. Kere, and I. Thesleff. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel tn timerceptor homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev*, 88(2) :133–46, 1999.
- [78] A. K. Srivastava, J. Pispa, A. J. Hartung, Y. Du, S. Ezer, T. Jenks, T. Shimada, M. Pekkanen, M. L. Mikkola, M. S. Ko, I. Thesleff, J. Kere, and D. Schlessinger. The tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the eda gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-a) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24) :13069–74, 1997.
- [79] T. Andl, S. T. Reddy, T. Gaddapara, and S. E. Millar. Wnt signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*, 2(5) :643–53, 2002.
- [80] A. Kumar, M. T. Eby, S. Sinha, A. Jasmin, and P. M. Chaudhary. The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, jnk, and cell death pathways and binds to ectodysplasin a. *J Biol Chem*, 276(4) :2668–77, 2001.
- [81] M. Yan, L. C. Wang, S. G. Hymowitz, S. Schilbach, J. Lee, A. Goddard, A. M. de Vos, W. Q. Gao, and V. M. Dixit. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*, 290(5491) :523–7, 2000.

-
- [82] G. Weinmaster. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci*, 9(2) :91–102, 1997.
 - [83] S. Artavanis-Tsakonas, K. Matsuno, and M. E. Fortini. Notch signaling. *Science*, 268(5208) :225–32, 1995.
 - [84] B. C. Powell, E. A. Passmore, A. Nesci, and S. M. Dunn. The notch signalling pathway in hair growth. *Mech Dev*, 78(1-2) :189–92, 1998.
 - [85] B. Favier, I. Fliniaux, J. Thelu, J. P. Viallet, M. Demarchez, C. A. Jahoda, and D. Dhouailly. Localisation of members of the notch system and the differentiation of vibrissa hair follicles : receptors, ligands, and fringe modulators. *Dev Dyn*, 218(3) :426–37, 2000.
 - [86] R. Crowe, D. Henrique, D. Ish-Horowicz, and L. Niswander. A new role for notch and delta in cell fate decisions : patterning the feather array. *Development*, 125(4) :767–75, 1998.
 - [87] R. Crowe and L. Niswander. Disruption of scale development by delta-1 misexpression. *Dev Biol*, 195(1) :70–4, 1998.
 - [88] A. Noveen, T. X. Jiang, S. A. Ting-Berreth, and C. M. Chuong. Homeobox genes *msx-1* and *msx-2* are associated with induction and growth of skin appendages. *J Invest Dermatol*, 104(5) :711–9, 1995.
 - [89] I. Satokata, L. Ma, H. Ohshima, M. Bei, I. Woo, K. Nishizawa, T. Maeda, Y. Takano, M. Uchiyama, S. Heaney, H. Peters, Z. Tang, R. Maxson, and R. Maas. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, 24(4) :391–5, 2000.
 - [90] H. K. Song, S. H. Lee, and P. F. Goetinck. Fgf-2 signaling is sufficient to induce dermal condensations during feather development. *Dev Dyn*, 231(4) :741–9, 2004.
 - [91] B. A. Morgan, R. W. Orkin, S. Noramly, and A. Perez. Stage-specific effects of sonic hedgehog expression in the epidermis. *Dev Biol*, 201(1) :1–12, 1998.
 - [92] C. Chiang, R. Z. Swan, M. Grachtchouk, M. Bolinger, Y. Litingtung, E. K. Robertson, M. K. Cooper, W. Gaffield, H. Westphal, P. A. Beachy, and A. A. Dlugosz. Essential role for sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, 205(1) :1–9, 1999.
 - [93] J. Lee, K. A. Platt, P. Censullo, and A. Ruiz i Altaba. Gli1 is a target of sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*, 124(13) :2537–52, 1997.
 - [94] V. Marigo, R. L. Johnson, A. Vortkamp, and C. J. Tabin. Sonic hedgehog differentially regulates expression of *gli* and *gli3* during limb development. *Dev Biol*, 180(1) :273–83, 1996.
 - [95] N. Dahmane, J. Lee, P. Robins, P. Heller, and A. Ruiz i Altaba. Activation of the transcription factor *gli1* and the sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389(6653) :876–81, 1997.

- [96] L. Ghali, S. T. Wong, J. Green, N. Tidman, and A. G. Quinn. Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. *J Invest Dermatol*, 113(4) :595–9, 1999.
- [97] K. A. Platt, J. Michaud, and A. L. Joyner. Expression of the mouse gli and ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech Dev*, 62(2) :121–35, 1997.
- [98] M. M. Matzuk, T. R. Kumar, A. Vassalli, J. R. Bickenbach, D. R. Roop, R. Jaenisch, and A. Bradley. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature*, 374(6520) :354–6, 1995.
- [99] G. Lindner, A. Menrad, E. Gherardi, G. Merlino, P. Welker, B. Handjiski, B. Roloff, and R. Paus. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *Faseb J*, 14(2) :319–32, 2000.
- [100] D. Pennisi, J. Bowles, A. Nagy, G. Muscat, and P. Koopman. Mice null for sox18 are viable and display a mild coat defect. *Mol Cell Biol*, 20(24) :9331–6, 2000.
- [101] R. Kopan and H. Weintraub. Mouse notch : expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J Cell Biol*, 121(3) :631–41, 1993.
- [102] M. H. Lin, C. Leimeister, M. Gessler, and R. Kopan. Activation of the notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers. *Development*, 127(11) :2421–32, 2000.
- [103] M. Nicolas, A. Wolfer, K. Raj, J. A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C. C. Hui, H. Clevers, G. P. Dotto, and F. Radtke. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, 33(3) :416–21, 2003.
- [104] A. Rangarajan, C. Talora, R. Okuyama, M. Nicolas, C. Mammucari, H. Oh, J. C. Aster, S. Krishna, D. Metzger, P. Chambon, L. Miele, M. Aguet, F. Radtke, and G. P. Dotto. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J*, 20(13) :3427–36, 2001.
- [105] S. E. Millar, K. Willert, P. C. Salinas, H. Roelink, R. Nusse, D. J. Sussman, and G. S. Barsh. Wnt signaling in the control of hair growth and structure. *Dev Biol*, 207(1) :133–49, 1999.
- [106] P. Zhou, C. Byrne, J. Jacobs, and E. Fuchs. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev*, 9(6) :700–13, 1995.
- [107] H. Kulesa, G. Turk, and B. L. Hogan. Inhibition of bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *Embo J*, 19(24) :6664–74, 2000.
- [108] N. Wilson, P. I. Hynd, and B. C. Powell. The role of bmp-2 and bmp-4 in follicle initiation and the murine hair cycle. *Exp Dermatol*, 8(4) :367–8, 1999.

-
- [109] M. Blessing, L. B. Nanne, L. E. King, C. M. Jones, and B. L. Hogan. Transgenic mice as a model to study the role of tgfbeta-related molecules in hair follicles. *Genes Dev*, 7(2) :204–15, 1993.
 - [110] R. Krumlauf. Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78(2) :191–201, 1994.
 - [111] A. R. Godwin and M. R. Capecchi. Hair defects in hoxc13 mutant mice. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4(3) :244–7, 1999.
 - [112] A. V. Tkatchenko, R. P. Visconti, L. Shang, T. Papenbrock, N. D. Pruet, T. Ito, M. Ogawa, and A. Awgulewitsch. Overexpression of hoxc13 in differentiating keratinocytes results in downregulation of a novel hair keratin gene cluster and alopecia. *Development*, 128(9) :1547–58, 2001.
 - [113] D. Dhouailly. [genetic expression and morphogenesis of the skin in vertebrates]. *Ann Genet*, 36(1) :47–55, 1993.
 - [114] D. Duboule. Hox is in the hair : a break in colinearity ? *Genes Dev*, 12(1) :1–4, 1998.
 - [115] B. Kanzler, J. P. Viallet, H. Le Mouellic, E. Boncinelli, D. Duboule, and D. Dhouailly. Differential expression of two different homeobox gene families during mouse tegument morphogenesis. *Int J Dev Biol*, 38(4) :633–40, 1994.
 - [116] K. Detmer, H. J. Lawrence, and C. Largman. Expression of class i homeobox genes in fetal and adult murine skin. *J Invest Dermatol*, 101(4) :517–22, 1993.
 - [117] A. R. Godwin, H. S. Stadler, K. Nakamura, and M. R. Capecchi. Detection of targeted gfp-hox gene fusions during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(22) :13042–7, 1998.
 - [118] A. D. Reginelli, Y. Q. Wang, D. Sassoon, and K. Muneoka. Digit tip regeneration correlates with regions of msx1 (hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development*, 121(4) :1065–76, 1995.
 - [119] M. J. Beanan and T. D. Sargent. Regulation and function of dlx3 in vertebrate development. *Dev Dyn*, 218(4) :545–53, 2000.
 - [120] J. A. Price, D. W. Bowden, J. T. Wright, M. J. Pettenati, and T. C. Hart. Identification of a mutation in dlx3 associated with tricho-dento-osseous (tdo) syndrome. *Hum Mol Genet*, 7(3) :563–9, 1998.
 - [121] J. A. Price, J. T. Wright, K. Kula, D. W. Bowden, and T. C. Hart. A common dlx3 gene mutation is responsible for tricho-dento-osseous syndrome in virginia and north carolina families. *J Med Genet*, 35(10) :825–8, 1998.
 - [122] S. Blanchet, B. Favier, G. Chevalier, P. Kastner, J. J. Michaille, P. Chambon, and D. Dhouailly. Both retinoic acid receptors alpha (rara) and gamma (rarg) are able to initiate mouse upper-lip skin glandular metaplasia. *J Invest Dermatol*, 111(2) :206–12, 1998.
 - [123] J. P. Viallet and D. Dhouailly. Retinoic acid and mouse skin morphogenesis. ii. role of epidermal competence in hair glandular metaplasia. *Dev Biol*, 166(1) :277–88, 1994.

- [124] J. P. Viallet and D. Dhouailly. Retinoic acid and mouse skin morphogenesis. i. expression pattern of retinoic acid receptor genes during hair vibrissa follicle, plantar, and nasal gland development. *J Invest Dermatol*, 103(1) :116–21, 1994.
- [125] P. Chambon. The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene*, 135(1-2) :223–8, 1993.
- [126] R. F. Oliver and C. A. Jahoda. Dermal-epidermal interactions. *Clin Dermatol*, 6(4) :74–82, 1988.
- [127] V. A. Botchkarev and J. Kishimoto. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 8(1) :46–55, 2003.
- [128] T. A. Rosenquist and G. R. Martin. Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle : expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Dev Dyn*, 205(4) :379–86, 1996.
- [129] K. K. Mak and S. Y. Chan. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle. *J Biol Chem*, 278(28) :26120–6, 2003.
- [130] R. Murillas, F. Larcher, C. J. Conti, M. Santos, A. Ullrich, and J. L. Jorcano. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *Embo J*, 14(21) :5216–23, 1995.
- [131] P. J. Miettinen, J. E. Berger, J. Meneses, Y. Phung, R. A. Pedersen, Z. Werb, and R. Derynck. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 376(6538) :337–41, 1995.
- [132] D. W. Threadgill, A. A. Dlugosz, L. A. Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mourton, K. Herrup, R. C. Harris, and et al. Targeted disruption of mouse egf receptor : effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269(5221) :230–4, 1995.
- [133] M. Li, H. Chiba, X. Warot, N. Messaddeq, C. Gerard, P. Chambon, and D. Metzger. Rxr-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development*, 128(5) :675–88, 2001.
- [134] M. Li, A. K. Indra, X. Warot, J. Brocard, N. Messaddeq, S. Kato, D. Metzger, and P. Chambon. Skin abnormalities generated by temporally controlled rxralpha mutations in mouse epidermis. *Nature*, 407(6804) :633–6, 2000.
- [135] Y. C. Li, A. E. Pirro, M. Amling, G. Delling, R. Baron, R. Bronson, and M. B. Demay. Targeted ablation of the vitamin d receptor : an animal model of vitamin d-dependent rickets type ii with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(18) :9831–5, 1997.

- [136] J. Reichrath, M. Schilli, A. Kerber, F. A. Bahmer, B. M. Czarnetzki, and R. Paus. Hair follicle expression of 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptors during the murine hair cycle. *Br J Dermatol*, 131(4) :477–82, 1994.
- [137] N. Weger and T. Schlake. Igf-i signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J Invest Dermatol*, 125(5) :873–82, 2005.
- [138] H. Y. Su, J. G. Hickford, R. Bickerstaffe, and B. R. Palmer. Insulin-like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol Online J*, 5(2) :1, 1999.
- [139] S. M. Rudman, M. P. Philpott, G. A. Thomas, and T. Kealey. The role of igf-i in human skin and its appendages : morphogen as well as mitogen ? *J Invest Dermatol*, 109(6) :770–7, 1997.
- [140] J. Kishimoto, R. E. Burgeson, and B. A. Morgan. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev*, 14(10) :1181–5, 2000.
- [141] L. C. Wang, Z. Y. Liu, L. Gambardella, A. Delacour, R. Shapiro, J. Yang, I. Sizing, P. Rayhorn, E. A. Garber, C. D. Benjamin, K. P. Williams, F. R. Taylor, Y. Barrandon, L. Ling, and L. C. Burkly. Regular articles : conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *J Invest Dermatol*, 114(5) :901–8, 2000.
- [142] N. Sato, P. L. Leopold, and R. G. Crystal. Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of sonic hedgehog. *J Clin Invest*, 104(7) :855–64, 1999.
- [143] W. Ahmad, M. Faiyaz ul Haque, V. Brancolini, H. C. Tsou, S. ul Haque, H. Lam, V. M. Aita, J. Owen, M. deBlaquiere, J. Frank, P. B. Cserhalmi-Friedman, A. Leask, J. A. McGrath, M. Peacocke, M. Ahmad, J. Ott, and A. M. Christiano. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science*, 279(5351) :720–4, 1998.
- [144] M. B. Cachon-Gonzalez, S. Fenner, J. M. Coffin, C. Moran, S. Best, and J. P. Stoye. Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(16) :7717–21, 1994.
- [145] V. A. Botchkarev, P. Welker, K. M. Albers, N. V. Botchkareva, M. Metz, G. R. Lewin, S. Bulfone-Paus, E. M. Peters, G. Lindner, and R. Paus. A new role for neurotrophin-3 : involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol*, 153(3) :785–99, 1998.
- [146] N. V. Botchkareva, V. A. Botchkarev, M. Metz, I. Silos-Santiago, and R. Paus. Retardation of hair follicle development by the deletion of trkc, high-affinity neurotrophin-3 receptor. *J Invest Dermatol*, 113(3) :425–7, 1999.
- [147] R. Paus, K. Foitzik, P. Welker, S. Bulfone-Paus, and S. Eichmuller. Transforming growth factor-beta receptor type i and type ii expression during murine hair follicle development and cycling. *J Invest Dermatol*, 109(4) :518–26, 1997.

- [148] P. Welker, K. Foitzik, S. Bulfone-Paus, B. M. Henz, and R. Paus. Hair cycle-dependent changes in the gene expression and protein content of transforming factor beta 1 and beta 3 in murine skin. *Arch Dermatol Res*, 289(9) :554–7, 1997.
- [149] K. Foitzik, G. Lindner, S. Mueller-Roever, M. Maurer, N. Botchkareva, V. Botchkarev, B. Handjiski, M. Metz, T. Hibino, T. Soma, G. P. Dotto, and R. Paus. Control of murine hair follicle regression (catagen) by *tgf-beta1* in vivo. *Faseb J*, 14(5) :752–60, 2000.
- [150] Y. Tsuji, S. Denda, T. Soma, L. Raftery, T. Momoi, and T. Hibino. A potential suppressor of *tgf-beta* delays catagen progression in hair follicles. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 8(1) :65–8, 2003.
- [151] J. M. Hebert, T. Rosenquist, J. Gotz, and G. R. Martin. *Fgf5* as a regulator of the hair growth cycle : evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, 78(6) :1017–25, 1994.
- [152] J. P. Sundberg, M. H. Rourk, D. Boggess, M. E. Hogan, B. A. Sundberg, and A. P. Bertolino. Angora mouse mutation : altered hair cycle, follicular dystrophy, phenotypic maintenance of skin grafts, and changes in keratin expression. *Vet Pathol*, 34(3) :171–9, 1997.
- [153] H. C. Brooke. hairless mice. *J Hereditary*, 17 :173–174, 1926.
- [154] L. Ma, J. Liu, T. Wu, M. Plikus, T. X. Jiang, Q. Bi, Y. H. Liu, S. Muller-Rover, H. Peters, J. P. Sundberg, R. Maxson, R. L. Maas, and C. M. Chuong. 'cyclic alopecia' in *msx2* mutants : defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development*, 130(2) :379–89, 2003.
- [155] T. X. Jiang, Y. H. Liu, R. B. Widelitz, R. K. Kundu, R. E. Maxson, and C. M. Chuong. Epidermal dysplasia and abnormal hair follicles in transgenic mice overexpressing homeobox gene *msx-2*. *J Invest Dermatol*, 113(2) :230–7, 1999.
- [156] N. Meier, T. N. Dear, and T. Boehm. *Wnt1* and *mha3* are components of the genetic hierarchy controlling hair follicle differentiation. *Mech Dev*, 89(1-2) :215–21, 1999.
- [157] 3rd Beaudoin, G. M., J. M. Sisk, P. A. Coulombe, and C. C. Thompson. Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting *wnt* signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(41) :14653–8, 2005.
- [158] R. Paus, K. S. Stenn, and R. E. Link. Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br J Dermatol*, 122(6) :777–84, 1990.
- [159] V. A. Botchkarev, N. V. Botchkareva, M. Nakamura, O. Huber, K. Funa, R. Lauster, R. Paus, and B. A. Gilchrist. *Noggin* is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *Faseb J*, 15(12) :2205–14, 2001.
- [160] D. J. Phippard, S. J. Weber-Hall, P. T. Sharpe, M. S. Naylor, H. Jayatalake, R. Maas, I. Woo, D. Roberts-Clark, P. H. Francis-West, Y. H. Liu, R. Maxson, R. E. Hill, and T. C. Dale. Regulation

- of *msx-1*, *msx-2*, *bmp-2* and *bmp-4* during foetal and postnatal mammary gland development. *Development*, 122(9) :2729–37, 1996.
- [161] S. Chanda, C. L. Robinette, J. F. Couse, and R. C. Smart. 17 β -estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor- α pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278(2) :E202–10, 2000.
- [162] S. Itagaki, Y. Ishii, M. J. Lee, and K. Doi. Dermal histology of hairless rat derived from wistar strain. *Exp Anim*, 44(4) :279–84, 1995.
- [163] W. Ahmad, M. S. Ratterree, A. A. Panteleyev, V. M. Aita, J. P. Sundberg, and A. M. Christiano. Atrichia with papular lesions resulting from mutations in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) hairless gene. *Lab Anim*, 36(1) :61–7, 2002.
- [164] R. Finocchiaro, B. Portolano, G. Damiani, A. Caroli, E. Budelli, P. Bolla, and G. Pagnacco. The hairless (*hr*) gene is involved in the congenital hypotrichosis of Valle del Belice sheep. *Genet Sel Evol*, 35 Suppl 1 :S147–56, 2003.
- [165] G. B. Potter, 3rd Beaudoin, G. M., C. L. DeRenzo, J. M. Zarach, S. H. Chen, and C. C. Thompson. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev*, 15(20) :2687–701, 2001.
- [166] M. B. Cachon-Gonzalez, I. San-Jose, A. Cano, J. A. Vega, N. Garcia, T. Freeman, T. Schimmang, and J. P. Stoye. The hairless gene of the mouse : relationship of phenotypic effects with expression profile and genotype. *Dev Dyn*, 216(2) :113–26, 1999.
- [167] C. C. Thompson. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci*, 16(24) :7832–40, 1996.
- [168] G. B. Potter, J. M. Zarach, J. M. Sisk, and C. C. Thompson. The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol*, 16(11) :2547–60, 2002.
- [169] A. A. Panteleyev, C. van der Veen, T. Rosenbach, S. Muller-Rover, V. E. Sokolov, and R. Paus. Towards defining the pathogenesis of the hairless phenotype. *J Invest Dermatol*, 110(6) :902–7, 1998.
- [170] J. P. Stoye, S. Fenner, G. E. Greenoak, C. Moran, and J. M. Coffin. Role of endogenous retroviruses as mutagens : the hairless mutation of mice. *Cell*, 54(3) :383–91, 1988.
- [171] S. Cichon, M. Anker, I. R. Vogt, H. Rohleder, M. Putzstuck, A. Hillmer, S. A. Farooq, K. S. Al-Dhafri, M. Ahmad, S. Haque, M. Rietschel, P. Propping, R. Kruse, and M. M. Nothen. Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia. *Hum Mol Genet*, 7(11) :1671–9, 1998.

- [172] W. Ahmad, A. A. Panteleyev, V. Henson-Apollonio, J. P. Sundberg, and A. M. Christiano. Molecular basis of a novel rhino (hr(rhchr)) phenotype : a nonsense mutation in the mouse hairless gene. *Exp Dermatol*, 7(5) :298–301, 1998.
- [173] W. Ahmad, A. A. Panteleyev, J. P. Sundberg, and A. M. Christiano. Molecular basis for the rhino (hrrh-8j) phenotype : a nonsense mutation in the mouse hairless gene. *Genomics*, 53(3) :383–6, 1998.
- [174] J. T. Zhang, S. G. Fang, and C. Y. Wang. A novel nonsense mutation and polymorphisms in the mouse hairless gene. *J Invest Dermatol*, 124(6) :1200–5, 2005.
- [175] A. A. Panteleyev, W. Ahmad, A. M. Malashenko, E. L. Ignatieva, R. Paus, J. P. Sundberg, and A. M. Christiano. Molecular basis for the rhino yurlovo (hr(rhy)) phenotype : severe skin abnormalities and female reproductive defects associated with an insertion in the hairless gene. *Exp Dermatol*, 7(5) :281–8, 1998.
- [176] J. M. Jones, J. T. Elder, K. Simin, S. A. Keller, and M. H. Meisler. Insertional mutation of the hairless locus on mouse chromosome 14. *Mamm Genome*, 4(11) :639–43, 1993.
- [177] M. V. Brancaz, R. Iratni, A. Morrison, S. J. Mancini, P. Marche, J. Sundberg, and S. Nonchev. A new allele of the mouse hairless gene interferes with hox/lacz transgene regulation in hair follicle primordia. *Exp Mol Pathol*, 76(2) :173–81, 2004.
- [178] W. Ahmad, K. Nomura, J. A. McGrath, I. Hashimoto, and A. M. Christiano. A homozygous nonsense mutation in the zinc-finger domain of the human hairless gene underlies congenital atrichia. *J Invest Dermatol*, 113(2) :281–3, 1999.
- [179] W. Ahmad, A. Panteleyev, and A. M. Christiano. Molecular basis of congenital atrichia in humans and mice. *Cutis*, 64(4) :269–76, 1999.
- [180] W. Ahmad, A. A. Panteleyev, and A. M. Christiano. The molecular basis of congenital atrichia in humans and mice : mutations in the hairless gene. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4(3) :240–3, 1999.
- [181] W. Ahmad, A. Zlotogorski, A. A. Panteleyev, H. Lam, M. Ahmad, M. F. ul Haque, H. M. Abdallah, L. Dragan, and A. M. Christiano. Genomic organization of the human hairless gene (hr) and identification of a mutation underlying congenital atrichia in an arab palestinian family. *Genomics*, 56(2) :141–8, 1999.
- [182] I. Klein, R. Bergman, M. Indelman, and E. Sprecher. A novel missense mutation affecting the human hairless thyroid receptor interacting domain 2 causes congenital atrichia. *J Invest Dermatol*, 119(4) :920–2, 2002.

- [183] E. Sprecher, R. Bergman, R. Szargel, R. Friedman-Birnbaum, and N. Cohen. Identification of a genetic defect in the hairless gene in atrichia with papular lesions : evidence for phenotypic heterogeneity among inherited atrichias. *Am J Hum Genet*, 64(5) :1323–9, 1999.
- [184] E. Sprecher, G. G. Lestringant, R. Szargel, R. Bergman, V. Labay, P. M. Frossard, R. Friedman-Birnbaum, and N. Cohen. Atrichia with papular lesions resulting from a nonsense mutation within the human hairless gene. *J Invest Dermatol*, 113(4) :687–90, 1999.
- [185] A. Zlotogorski, Z. Hochberg, P. Mirmirani, A. Metzker, D. Ben-Amitai, A. Martinez-Mir, A. A. Panteleyev, and A. M. Christiano. Clinical and pathologic correlations in genetically distinct forms of atrichia. *Arch Dermatol*, 139(12) :1591–6, 2003.
- [186] V. del Castillo, R. Ruiz-Maldonado, and A. Carnevale. Atrichia with papular lesions and mental retardation in two sisters. *Int J Dermatol*, 13(5) :261–5, 1974.
- [187] N. Garcia-Atares, I. San Jose, R. Cabo, J. A. Vega, and J. Represa. Changes in the cerebellar cortex of hairless rhino-j mice (hr-rh-j). *Neurosci Lett*, 256(1) :13–6, 1998.
- [188] V. M. Aita, W. Ahmad, A. A. Panteleyev, U. Kozłowska, A. Kozłowska, T. C. Gilliam, S. Jablonska, and A. M. Christiano. A novel missense mutation (c622g) in the zinc-finger domain of the human hairless gene associated with congenital atrichia with papular lesions. *Exp Dermatol*, 9(2) :157–62, 2000.
- [189] K. Djabali, V. M. Aita, and A. M. Christiano. Hairless is translocated to the nucleus via a novel bipartite nuclear localization signal and is associated with the nuclear matrix. *J Cell Sci*, 114(Pt 2) :367–76, 2001.
- [190] C. C. Thompson and M. C. Bottcher. The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16) :8527–32, 1997.
- [191] J. C. Hsieh, J. M. Sisk, P. W. Jurutka, C. A. Haussler, S. A. Slater, M. R. Haussler, and C. C. Thompson. Physical and functional interaction between the vitamin d receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem*, 278(40) :38665–74, 2003.
- [192] J. Miller, K. Djabali, T. Chen, Y. Liu, M. Ioffreda, S. Lyle, A. M. Christiano, M. Holick, and G. Cotsarelis. Atrichia caused by mutations in the vitamin d receptor gene is a phenocopy of generalized atrichia caused by mutations in the hairless gene. *J Invest Dermatol*, 117(3) :612–7, 2001.
- [193] C. C. Thompson and G. B. Potter. Thyroid hormone action in neural development. *Cereb Cortex*, 10(10) :939–45, 2000.
- [194] C. C. Thompson, J. M. Sisk, and 3rd Beaudoin, G. M. Hairless and wnt signaling : allies in epithelial stem cell differentiation. *Cell Cycle*, 5(17) :1913–7, 2006.

- [195] L. Xu, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*, 9(2) :140–7, 1999.
- [196] P. M. Clissold and C. P. Ponting. Jmjc : cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase a2beta. *Trends Biochem Sci*, 26(1) :7–9, 2001.
- [197] J. Knebel, L. De Haro, and R. Janknecht. Repression of transcription by tsga/jmjd1a, a novel interaction partner of the ets protein er71. *J Cell Biochem*, 99(1) :319–29, 2006.
- [198] T. Takeuchi, Y. Watanabe, T. Takano-Shimizu, and S. Kondo. Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn*, 235(9) :2449–59, 2006.
- [199] Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. Histone demethylation by a family of jmjc domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078) :811–6, 2006.
- [200] A. A. Panteleyev, R. Paus, and A. M. Christiano. Patterns of hairless (hr) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol*, 157(4) :1071–9, 2000.
- [201] A. Howard. "rhino", an allele of hairless in the mouse. *J Hereditary*, 31 :467–470, 1940.
- [202] S. J. Mann. Varieties of hairless-like mutant mice. *J Invest Dermatol*, 56(3) :170–3, 1971.
- [203] G. D. Snell. Inheritance in the house mouse, the linkage relations of short-ear, hairless, and naked. *Genetics*, 16(1) :42–74, 1931.
- [204] A. A. Panteleyev, R. Paus, W. Ahmad, J. P. Sundberg, and A. M. Christiano. Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans. *Exp Dermatol*, 7(5) :249–67, 1998.
- [205] F. Bernerd, J. Schweizer, and M. Demarchez. Dermal cysts of the rhino mouse develop into unopened sebaceous glands. *Arch Dermatol Res*, 288(10) :586–95, 1996.
- [206] R. E. Davies, W. A. Austin, and M. K. Logani. The rhino mutant mouse as an experimental tool. *Trans N Y Acad Sci*, 33(7) :680–93, 1971.
- [207] L. H. Kligman and A. M. Kligman. The effect on rhino mouse skin of agents which influence keratinization and exfoliation. *J Invest Dermatol*, 73(5) :354–8, 1979.
- [208] S. Muller-Rover, E. J. Peters, V. A. Botchkarev, A. Panteleyev, and R. Paus. Distinct patterns of ncam expression are associated with defined stages of murine hair follicle morphogenesis and regression. *J Histochem Cytochem*, 46(12) :1401–10, 1998.
- [209] A. A. Panteleyev, N. V. Botchkareva, J. P. Sundberg, A. M. Christiano, and R. Paus. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation. *Am J Pathol*, 155(1) :159–71, 1999.

- [210] I. Klein, R. Bergman, M. Indelman, and E. Sprecher. A newborn presenting with congenital blistering. *Int J Dermatol*, 43(4) :295–7, 2004.
- [211] G. G. Ashoor, R. M. Greenstein, H. Lam, A. Martinez-Mir, A. Zlotogorski, and A. M. Christiano. Novel compound heterozygous nonsense mutations in the hairless gene causing atrichia with papular lesions. *J Dermatol Sci*, 40(1) :29–33, 2005.
- [212] R. C. Betz, M. Indelman, J. Pforr, F. Schreiner, R. Bauer, R. Bergman, M. J. Lentze, M. M. Nothen, S. Cichon, and E. Sprecher. Identification of mutations in the human hairless gene in two new families with congenital atrichia. *Arch Dermatol Res*, 299(3) :157–61, 2007.
- [213] P. John, M. Aslam, M. A. Rafiq, M. Amin-ud din, S. Haque, and W. Ahmad. Atrichia with papular lesions in two pakistani consanguineous families resulting from mutations in the human hairless gene. *Arch Dermatol Res*, 297(5) :226–30, 2005.
- [214] M. Masse, A. Martinez-Mir, H. Lam, M. T. Geraghty, and A. M. Christiano. Identification of a recurrent mutation in the human hairless gene underlying atrichia with papular lesions. *Clin Exp Dermatol*, 30(4) :363–5, 2005.
- [215] E. Michailidis, A. Theos, A. Zlotogorski, A. Martinez-Mir, and A. M. Christiano. Atrichia with papular lesions resulting from novel compound heterozygous mutations in the human hairless gene. *Pediatr Dermatol*, 24(5) :E79–82, 2007.
- [216] G. M. O'Regan, J. Zurada, A. Martinez-Mir, A. M. Christiano, and A. D. Irvine. A recurrent splice-site mutation in the human hairless gene underlies congenital atrichia in irish families. *Br J Dermatol*, 156(4) :744–7, 2007.
- [217] M. Paradisi, M. Masse, A. Martinez-Mir, H. Lam, C. Pedicelli, and A. M. Christiano. Identification of a novel splice site mutation in the human hairless gene underlying atrichia with papular lesions. *Eur J Dermatol*, 15(5) :332–8, 2005.
- [218] A. Wali, M. Ansar, M. N. Khan, and W. Ahmad. Atrichia with papular lesions resulting from a novel insertion mutation in the human hairless gene. *Clin Exp Dermatol*, 31(5) :695–8, 2006.
- [219] M. Indelman, R. Bergman, G. G. Lestringant, G. Peer, and E. Sprecher. Compound heterozygosity for mutations in the hairless gene causes atrichia with papular lesions. *Br J Dermatol*, 148(3) :553–7, 2003.
- [220] C. Misciali, A. Tosti, P. A. Fanti, P. Borrello, and B. M. Piraccini. Atrichia and papular lesions : report of a case. *Dermatology*, 185(4) :284–8, 1992.
- [221] D. T. Harris, J. LoCascio, A. Acevedo, G. B. Olson, J. Bard, and E. A. Boyse. Analysis of the hairless mouse as a model for the effects of aging on the immune system. *Immunol Lett*, 36(1) :19–26, 1993.

- [222] I. San Jose, O. Garcia-Suarez, J. Hannestad, R. Cabo, L. Gauna, J. Represa, and J. A. Vega. The thymus of the hairless rhino-j (hr/rh-j) mice. *J Anat*, 198(Pt 4) :399–406, 2001.
- [223] Z. Blandova, L.V. Beletskaya, D.L. Belyaev, A.M. Malashenko, V.P. Bukhova, and I.Y. Mudrenko. Genetic analysis and investigation of immunopathology in nude b10-hr rhy mice. *Immunology*, 3(25-28), 1984.
- [224] F. M. L. Crew. The character "hairless" in the mouse. *J Genet*, 25 :17–24, 1931.
- [225] R. E. Billingham and W. K. Silvers. Transplantation and cutaneous genetics. *J Invest Dermatol*, 60(6) :509–15, 1973.
- [226] J. Sundberg. The hairless (hr) an rhino (hr rh) mutations, chromosome 14. *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities*, pages 291–312, 1994.
- [227] R. M. Evans. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854) :889–95, 1988.
- [228] D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans. The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell*, 83(6) :835–9, 1995.
- [229] N. J. McKenna and B. W. O'Malley. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4) :465–74, 2002.
- [230] D. J. Mangelsdorf and R. M. Evans. The rxr heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83(6) :841–50, 1995.
- [231] A. N. Moraitis, V. Giguere, and C. C. Thompson. Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol*, 22(19) :6831–41, 2002.
- [232] L. G. Komuves, E. Michael, J. M. Arbeit, X. K. Ma, A. Kwong, E. Stelnicki, S. Rozenfeld, M. Morimune, Q. C. Yu, and C. Largman. Hoxb4 homeodomain protein is expressed in developing epidermis and skin disorders and modulates keratinocyte proliferation. *Dev Dyn*, 224(1) :58–68, 2002.
- [233] J. M. Zarach, 3rd Beaudoin, G. M., P. A. Coulombe, and C. C. Thompson. The co-repressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin. *Development*, 131(17) :4189–200, 2004.
- [234] V. E. Krupnik, J. D. Sharp, C. Jiang, K. Robison, T. W. Chickering, L. Amaravadi, D. E. Brown, D. Guyot, G. Mays, K. Leiby, B. Chang, T. Duong, A. D. Goodearl, D. P. Gearing, S. Y. Sokol, and S. A. McCarthy. Functional and structural diversity of the human dickkopf gene family. *Gene*, 238(2) :301–13, 1999.

- [235] R. J. Klose, K. Yamane, Y. Bae, D. Zhang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, and Y. Zhang. The transcriptional repressor jhdm3a demethylates trimethyl histone h3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, 442(7100) :312–6, 2006.
- [236] K. Yamane, C. Toumazou, Y. Tsukada, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, and Y. Zhang. Jhdm2a, a jmjc-containing h3k9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, 125(3) :483–95, 2006.
- [237] K. Djabali, A. Zlotogorski, A. Metzker, D. Ben-Amitai, and A. M. Christiano. Interaction of hairless and thyroid hormone receptor is not involved in the pathogenesis of atrichia with papular lesions. *Exp Dermatol*, 13(4) :251–6, 2004.
- [238] D. Chen, H. Ma, H. Hong, S. S. Koh, S. M. Huang, B. T. Schurter, D. W. Aswad, and M. R. Stallcup. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, 284(5423) :2174–7, 1999.
- [239] H. Wang, Z. Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B. D. Strahl, S. D. Briggs, C. D. Allis, J. Wong, P. Tempst, and Y. Zhang. Methylation of histone h4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, 293(5531) :853–7, 2001.
- [240] M. V. Brancaz-Bouvier, E. J. Folco, D. Salameire, Y. Romero, R. Iratni, and S. Nonchev. The "bald mill hill" mutation in the mouse is associated with an abnormal, mislocalized hr bmh protein. *J Invest Dermatol*, 2007.
- [241] S. Nonchev, M. V. Brancaz, E. Folco, Y. Romero, and R. Iratni. [the mouse hairless gene : its function in hair root and at the heart of a subtle pleiotropy]. *Med Sci (Paris)*, 22(5) :525–30, 2006.
- [242] B.A. Bernard. [hairless and genetic disorders of hair]. *Med Sci (Paris)*, 18(3) :276–280, 2002.
- [243] A. Engelhard and A. M. Christiano. The hairless promoter is differentially regulated by thyroid hormone in keratinocytes and neuroblastoma cells. *Exp Dermatol*, 13(4) :257–64, 2004.
- [244] D. D. Bikle, C. L. Tu, Z. Xie, and Y. Oda. Vitamin d regulated keratinocyte differentiation : role of coactivators. *J Cell Biochem*, 88(2) :290–5, 2003.
- [245] D. D. Bikle, H. Elalieh, S. Chang, Z. Xie, and J. P. Sundberg. Development and progression of alopecia in the vitamin d receptor null mouse. *J Cell Physiol*, 207(2) :340–53, 2006.
- [246] M. Plateroti, K. Gauthier, C. Domon-Dell, J. N. Freund, J. Samarut, and O. Chassande. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (tralpha) and natural truncated trdeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol*, 21(14) :4761–72, 2001.
- [247] J. R. Parnes and J. G. Seidman. Structure of wild-type and mutant mouse beta 2-microglobulin genes. *Cell*, 29(2) :661–9, 1982.
- [248] X. J. Yang and S. Gregoire. Class ii histone deacetylases : from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*, 25(8) :2873–84, 2005.

- [249] S. Khochbin, A. Verdel, C. Lemerrier, and D. Seigneurin-Berny. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, 11(2) :162–6, 2001.
- [250] D. Seigneurin-Berny, A. Verdel, S. Curtet, C. Lemerrier, J. Garin, S. Rousseaux, and S. Khochbin. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex : link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 21(23) :8035–44, 2001.
- [251] A. Verdel, S. Curtet, M. P. Brocard, S. Rousseaux, C. Lemerrier, M. Yoshida, and S. Khochbin. Active maintenance of mhda2/mhdac6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*, 10(12) :747–9, 2000.

**ANALYSIS OF THE HAIRLESS GENE REGULATION AND IDENTIFICATION OF THE SIGNALLING
PATHWAYS MODIFIED ON “BALD MILL HILL” MUTANT MICE.**

Abstract : In Mammals, the gene *hairless* (*Hr*) encodes a nuclear factor strongly expressed in skin and crucial in controlling hair follicle integrity and cycling. In the absence of a normal and functional Hairless protein, the hair bulb undergoes premature apoptosis linked to complete and irreversible loss of hair follicles. The hairless phenotype is caused by defective proliferation and migration of the hair follicle stem cells, apparently unable to respond to various signalling molecules. The HR protein is localised in cell nuclei, tightly bound to nuclear matrix and functions as a corepressor for nuclear hormone receptors by its association to chromatin remodelling factors. At least in the skin, but probably in other organs, the HR repressor seems to be responsible for the timing of epithelial cells differentiation and tegument stem cells identity. The spatial and temporal *Hr* gene regulation is still poorly understood and the partners of HR protein await to be identified. The main objectives of the thesis were therefore to shed more light on the molecular basis underlying *Hr* gene function as well as on the HR protein implication in signalling pathways responsible for skin and hair follicle homeostasis. The first part of this thesis is thus focused on the fine mapping of cis-elements governing *Hr* gene basal promoter function and regulation. The precise transcriptional initiation start site of the mouse *Hr* gene was determined and a new 1,1 kb cis-control element (RE1) able to drive reporter expression in skin and brain derived cell lines was identified. A deletion analysis and functional exploration have shown that the role of this upstream region is linked to the presence of TR and VDR binding sites. In addition, a novel cis-regulatory motif UE60, likely to interact with both TRE and VDRE was defined. Taken together these findings reveal a complex molecular network that potentially links several signalling pathways in hair follicle formation and stress the importance of the organisation of the regulatory modules at the *Hr* locus in Mammals. A substantial part of the thesis work is dedicated to unravelling the signalling pathways where the *Hr* gene and the HR protein play a crucial role to control the hair cycle itself. A recently described mouse mutation-hairless rhino bald Mill Hill, (*Hr^{rhbmh}*), was used here as a model system to approach interactions with the vitamin D signalling. It was demonstrated that the mutant HR bmh protein, although abnormally localised in the cytoplasm, is able to interact with the vitamin D receptor, but is not able to repress VDR-mediated transactivation. Immunofluorescence analysis revealed that HRbmh protein displays an abnormal cellular localization in transfected cell lines, as well as in the epidermis and hair follicle of bmh mutant mice. Finally, the patterns of HRbmh protein extra-nuclear localization were analysed in cell transfection experiments. It was established that HR bmh co-localizes specifically with the protein HDAC6, in the cytoplasm and is able to physically interact with it. The association of HR bmh with this Ub-binding protein as well as its localisation in late endosomes and lysosomes suggest that endosomal processing and/or proteasome related pathways might be able to shape and modulate the specific skin phenotype of bmh mouse hairless mutants. **Key words :** hairless gene, cis-regulation, promoter, DNA binding, hair follicle, hair cycle, subcellular localisation, corepressor, nuclear hormone receptors.

Thèse préparée au laboratoire OST (Ontogenèse et Cellules Souches du Téguments), Institut Albert Bonniot,
Centre de Recherche INSERM/ UJF U823, Site Santé, La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9

ISBN